

Die funktionelle Rolle des Wachstumsfaktors Connective Tissue Growth Factor in der Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sabrina Angela Küspert geb. Kessel

aus Selb

im Jahr 2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
07.10.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von:
PD Dr. Rudolf Fuchshofer

Unterschrift:

In Gedenken an meinen lieben Opa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	6
1.1 Zusammenfassung.....	6
1.2 Abstract.....	8
2 Einleitung	10
2.1 Anatomie des Auges.....	11
2.1.1 Anatomie des vorderen Augenabschnitts.....	11
2.1.1.1 Aufbau und Funktion des Trabekelwerks	11
2.1.1.2 Regulationsmechanismen des Kammerwasserabflusses	13
2.1.1.3 Wege und Funktion des Kammerwassers.....	14
2.1.2 Anatomie des hinteren Augenabschnitts	15
2.1.2.1 Aufbau und Funktion der retinalen Ganglienzellen	15
2.2 Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms.....	17
2.2.1 Pathologische Veränderungen	17
2.2.2 Molekulare Hintergründe	18
2.2.2.1 Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2)	18
2.2.2.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	20
2.2.2.3 Signalkaskade von TGF- β und BMPs	21
2.2.2.4 Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	23
2.3 Zielsetzung.....	26
3 Material und Methoden	28
3.1 Materialliste.....	28
3.1.1 Reagenzienliste.....	28
3.1.2 Enzyme und Reagenzien-Kits	31
3.1.3 Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter.....	31
3.1.4 Antikörper und Proteinstandard.....	34
3.1.5 Rezepte für Lösungen und Puffer	35
3.1.6 Geräte	38
3.1.7 Verbrauchsmaterialien	40
3.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	41

3.2.1	Gewinnung genomischer DNA	41
3.2.2	PCR-Analysen zur Genotypisierung der β B1-Tiere.....	41
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.3	Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time RT-PCR	44
3.3.1	Prinzip der quantitativen Real-Time RT-PCR.....	44
3.3.2	RNA-Isolation	45
3.3.3	RNA-Quantifizierung	46
3.3.4	cDNA-Herstellung	46
3.3.5	Durchführung der quantitativen Real-Time RT-PCR	47
3.3.6	Auswertung und Statistik.....	48
3.4	Biochemische Arbeitstechniken	49
3.4.1	Proteinpräparation.....	49
3.4.2	BCA-Assay.....	49
3.4.3	Western Blot Analyse	50
3.4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	50
3.4.3.2	Semidry Blotting	52
3.4.3.3	Nachweis spezifischer Proteinbanden	53
3.4.3.4	Quantifizierung mittels Ladungskontrolle	56
3.5	Zellkulturtechniken	57
3.5.1	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	57
3.5.1.1	Passagieren der verwendeten Zelllinien und Zellzählung	58
3.5.1.2	Lagerung der Zellen	58
3.5.2	<i>In vitro</i> -Experimente	59
3.5.2.1	HTM-N-Zellbehandlungen.....	59
3.5.2.2	Induktion	59
3.5.2.3	Inhibition.....	60
3.5.2.4	Differenzierung und Behandlung von 661-W-Zellen	62
3.5.2.5	Behandlung von primären RGZ-Zellen.....	65
3.6	<i>In vivo</i>-Experimente	66
3.6.1	Versuchstiere und Tierhaltung	66
3.6.2	Präparation der zu analysierenden Gewebe	67
3.6.2.1	Herzkammer-Perfusion	67
3.6.2.2	Entnahme der Augen, Sehnerven und Schwanzspitzen	68
3.6.2.3	Cornea- und Retinapräparation.....	69

3.6.3	Intravitreale Injektionen	69
3.6.3.1	Durchführung	69
3.6.3.2	Quantifizierung der RGZ-Axonanzahl	71
3.6.3.3	Quantifizierung apoptotischer RGZ-Zellen	71
3.7	Histologische Arbeitstechniken	72
3.7.1	Einbettung und Herstellung von Gefrierschnitten	72
3.7.2	Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten	73
3.7.3	Epon-Einbettung und Herstellung von semi-Dünnschnitten	73
3.7.4	Histochemische Färbungen	74
3.7.4.1	Färbungen von Gefrierschnitten	74
3.7.4.2	Färbungen von Paraffinschnitten	76
3.7.4.3	Färbungen von Zellen	76
3.7.4.4	Kontrastierung der <i>Nervi optici</i>	76
3.8	Mikroskopie	77
3.9	Auswertung und Statistik	77
4	Ergebnisse	79
4.1	Analyse der Effekte von CTGF im vorderen Augenabschnitt	79
4.1.1	Auswirkungen auf den BMP-Signalweg und die BMP-Expression	79
4.1.1.1	Inhibition des BMP-Signalwegs durch CTGF	79
4.1.1.2	CTGF reduziert die Expression von BMP4 und -7	83
4.1.1.3	Gremlin, ein BMP-Antagonist, wird durch CTGF induziert	86
4.1.2	Auswirkungen von CTGF auf den TGF- β -Signalweg und auf die TGF- β 1 und -2 Expression	87
4.1.2.1	Steigerung der Expression von TGF- β 1 und -2	87
4.1.2.2	CTGF steigert die Synthese von TGF- β 1, -2 und hat einen autoinduktiven Effekt	90
4.1.2.3	Anstieg der TGF- β -Signalantwort durch CTGF	99
4.1.3	Auswirkungen von CTGF auf die inhibitorischen Smad Proteine (Smad6 und -7)	101
4.2	Analyse der Effekte von CTGF im hinteren Augenabschnitt	103
4.2.1	Auswirkungen von CTGF auf den BMP- und TGF- β -Signalweg	103
4.2.1.1	Inhibition des BMP-Signalwegs durch CTGF	103
4.2.1.2	CTGF steigert die TGF- β -Signalantwort und inhibiert die Expression von Smad7	110

4.2.2	Auswirkung von CTGF und BMP auf das Überleben der RGZ-Zellen	111
4.2.2.1	Gesamtanzahl der Axone durch CTGF und BMP7 nicht verändert.....	112
4.2.2.2	CTGF und BMP7 haben keine signifikanten Effekte auf die Apoptose von RGZ-Zellen.....	114
4.2.2.3	Reduktion der Zellviabilität durch CTGF unter Stress-Bedingungen, während BMP7 diesen Effekt minimiert	115
4.2.3	Auswirkungen von CTGF und BMP4 bzw. -7 auf das Überleben der RGZ-Zellen im NMDA-Stressmodell.....	118
4.2.3.1	BMP7 zeigt einen protektiven Effekt auf die Zellviabilität	119
4.2.3.2	CTGF hat einen negativen und BMP4/7 einen positiven Einfluss auf die Zellviabilität der RGZ im NMDA–Stressmodell	120
4.2.3.3	BMP7 vermindert eine NMDA-induzierte Apoptose der RGZ-Zellen, wohingegen CTGF zum vermehrten Zelltod beiträgt	123
4.2.3.4	Die Empfindlichkeit der RGZ-Zellen auf Umwelteinflüsse wird durch CTGF erhöht	125
4.2.4	Auswirkungen von CTGF auf die Expression neurotropher Faktoren	128
4.2.4.1	PEDGF-, LEDGF- und GDNF-Expression wird <i>in vitro</i> durch CTGF vermindert.....	128
4.2.4.2	CTGF inhibiert den mRNA-Gehalt von NTF-3 <i>in vivo</i>	130
4.2.4.3	Inhibition von BDNF, CNTF und NTF-3 im β B1-Mausmodell	132
4.3	Analyse der Effekte von CTGF im Sehnerv von βB1-Mäusen	133
4.3.1	Reduktion von BDNF im β B1-Mausmodell.....	134
5	Diskussion.....	136
5.1	Kurzzusammenfassung	136
5.2	Analyse der Effekte von CTGF auf die Expression und Signaltransduktion der BMPs bzw. TGF-β.....	137
5.2.1	Modulation der BMP-Expression und Signaltransduktion	137
5.2.2	Effekte auf die TGF- β -Expression und -Signaltransduktion	139
5.2.3	Effekte von CTGF auf die inhibitorischen Smad6 und -7	141
5.3	Analyse der Effekte von CTGF, BMP4 und -7 auf die Viabilität der RGZ-Zellen.....	142
5.3.1	Auswirkungen der BMPs auf die Viabilität der RGZ-Zellen	142
5.3.2	Einfluss von CTGF auf die Viabilität der RGZ-Zellen	143

5.4	Wirkung von CTGF auf neurotrophe Faktoren	144
5.5	Ausblick	147
6	Literaturverzeichnis	150
7	Abkürzungsverzeichnis	163
8	Abbildungsverzeichnis	168
9	Tabellenverzeichnis	171
10	Danksagung	172
11	Erklärung	174

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) ist eine der häufigsten Ursachen für Erblindung (Quigley, 1996). Der größte Risikofaktor besteht im erhöhten Augeninnendruck (IOD) (Collaborative-Normal-Tension-Glaucoma-Study-Group, 1998 a + b; Gordon *et al.*, 2002; Leske *et al.*, 2003; The-AGIS-Investigators, 2000), der durch pathologische Veränderungen im Trabekelwerk (TW) hervorgerufen wird. Dieser Anstieg des IODs kann zum Absterben der retinalen Ganglienzellen (RGZ-Zellen) und damit zu einer irreversiblen Optikus-Neuropathie führen. Die Ursachen für diese Erkrankung sind auf molekularer Ebene noch weitgehend ungeklärt (Tamm und Fuchshofer, 2007). Annahmen zur Folge werden dem Transforming Growth Factor- β (TGF- β), seinem nachgeschaltetem Mediator Connective Tissue Growth Factor (CTGF) und den Bone Morphogenetic Proteinen (BMPs) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese dieser progressiven okulären Erkrankung zugesprochen (Junglas *et al.*, 2009; Wordinger *et al.*, 2007; Fuchshofer *et al.*, 2007). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Linsen-spezifische Überexpression von CTGF im Mausmodell ein POWG mit allen Charakteristika verursachte (Junglas *et al.*, 2012).

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Rolle von CTGF in der Pathogenese des POWGs benennen zu können und damit die molekularen Hintergründe zwischen den oben genannten Faktoren aufzudecken.

Die weiterführenden Studien am vorderen Augenabschnitt von 2 Monate alten β B1-CTGF-Mäusen und ihren Wildtyp (WT)-Geschwistertieren konnten zeigen, dass CTGF im Bereich des Kammerwasserabflusses zu einer starken Störung der homöostatischen Balance zwischen TGF- β und den BMPs führte. Neben einer Hemmung der BMP-Expression und deren Signalantwort konnte in den transgenen (TG)-Tieren auch ein vermehrtes Vorkommen von TGF- β 1 und -2 festgestellt werden, was in einer gesteigerten Aktivierung des TGF- β -Signalwegs mündete. Anhand von *in vitro*-Daten aus Inhibitionsanalysen ließen sich der für die CTGF-vermittelte Induktion der TGF- β -Isoformen verantwortliche Erk1/2- und RhoA/ROCK-Signalweg ermitteln. Ebenfalls können einige durch CTGF hervorgerufene extra- und

intrazelluläre Modifikationen auf faktorieller Ebene zu einer zusätzlichen Inhibition des BMP-Signalweges im Kammerwasserabflussgewebe beitragen.

Für die Untersuchungen des hinteren Augenabschnitts konnte mittels *in vitro*- und *in vivo*-Analysen festgestellt werden, dass CTGF in Kombination mit Stress direkt Einfluss auf die Viabilität der RGZ-Zellen nehmen und hierdurch einen erhöhten Verlust dieser Zellen provozieren kann. Diese erniedrigte Überlebensrate der RGZ-Zellen nach CTGF Behandlung kann durch protektive Eigenschaften von BMP4 und -7 revertiert werden. Auch trug CTGF zu einer Erniedrigung der neurotrophen Faktoren, die für das Überleben der RGZs benötigt werden, bei.

Im Bereich der Papille konnte eine Erniedrigung des neurotrophen Faktors Brain-derived Growth Factor (BDNF) bemerkt werden. Dies könnte Hinweise auf Umstrukturierungen der *Lamina cribrosa* geben, die zu einem progressiveren Krankheitsverlauf beitragen könnten.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Schlüsselrolle von CTGF in der Pathogenese des POWGs hin. Im vorderen Augenabschnitt trägt CTGF zu einem Ungleichgewicht der homöostatischen Balance zwischen TGF- β und den BMPs in Richtung TGF- β bei, wodurch ein erhöhter Abflusswiderstand in den Kammerwassergeweben gefördert werden kann. Jedoch ist die Rolle dieses Ungleichgewichts im hinteren Augenabschnitt noch ungewiss. In dieser Studie konnte allerdings zum ersten Mal gezeigt werden, dass CTGF in Kombination mit Stress negative Auswirkungen auf die Viabilität der RGZ-Zellen haben kann. Deshalb könnte die Modulierung der CTGF-Signalisierung eine vielversprechende Strategie zur Behandlung des POWGs sein.

1.2 Abstract

The primary open angle glaucoma (POAG) is one major cause of blindness worldwide (Quigley, 1996). The critical risk factor is an increased intraocular pressure (IOP) (Collaborative-Normal-Tension-Glaucoma-Study-Group, 1998 a + b; Gordon *et al.*, 2002; Leske *et al.*, 2003; The-AGIS-Investigators, 2000) caused by pathological changes in the trabecular meshwork (TM). The elevation of IOP leads to an irreversible damage of retinal ganglion cells (RGCs) and thereby contributes to an optic neuropathy. The molecular pathogenesis in POAG has not yet been identified (Tamm und Fuchshofer, 2007). However, there is some evidence that Transforming Growth Factor- β (TGF- β), its downstream-mediator Connective Tissue Growth Factor (CTGF) and the Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) may be involved in the pathogenesis of this progressive ocular disease (Junglas *et al.*, 2009; Wordinger *et al.*, 2007; Fuchshofer *et al.*, 2007). Recently, our group was able to show that the lens-specific overexpression of CTGF in mice causes POAG with all characteristics (Junglas *et al.*, 2012).

Therefore, the aim of this study was to identify the molecular background of these factors and to elucidate their functional role in the pathogenesis of POAG to approach new therapeutic strategies.

Further analysis of the anterior chambers of 2 month-old $\beta B1$ -Crystallin-CTGF mice and their wild-type littermates showed, that CTGF leads to a strong disruption of the homeostatic balance between TGF- β and the BMPs in the aqueous humor outflow tissues. Aside of a significant inhibition of the BMP-expression and its signaling, we were able to show an increased level of TGF- $\beta 1$ and -2 which was also associated with a higher activation of its signaling pathway. Analyzing inhibition experiments of *in vitro*-studies revealed the Erk- and RhoA/ROCK-signaling as responsible pathways for the CTGF-mediated induction of TGF- $\beta 1$ and -2. Furthermore, there were some extra- and intracellular factorial modifications initiated by CTGF which could enhance the inhibition of the BMP-signaling in the aqueous humour outflow tissues.

The *in vitro*- and *in vivo*-studies of the posterior chamber revealed, that CTGF in combination with stress had a direct effect on the viability of RGCs, leading to a higher loss of axons in the optic nerve. The resulting reduced viability was reversible by the protective effect of BMP4 and -7. Additionally CTGF could contribute to a decrease of neurotrophic factors which are important for RGCs survival

These results indicate that CTGF is a key modulator in the pathogenesis of POAG. In the anterior part of the eye CTGF shifts the homeostatic balance towards TGF- β and the BMPs into the direction of TGF- β thereby increasing the resistance of aqueous humor outflow. This is the first study to show that the imbalance in the posterior part of the eye is at least partly due to CTGF, which in combination with stress negatively affects the RGC viability. Concluding these results identify that a modification of CTGF signaling as a promising strategy to treat POAG.

2 Einleitung

Das *Glaucoma chronicum simplex* (Grüner Star) ist eine heterogene und altersdegenerative Erkrankung, die vor allem Menschen ab dem 40. Lebensjahr betrifft. Diese Erkrankung ist bis heute nicht heilbar und stellt weltweit eine der Hauptursachen für Erblindung dar (Quigley, 1996). Die Definition eines Glaukoms wird durch eine Optikus-Neuropathie begründet (Abbildung 2-1). Hierbei kommt es zu einem kontinuierlichen Verlust von Axonen der retinalen Ganglienzellen (RGZ-Zellen) im Bereich des Sehnervs (*Nervus opticus*) (Foster *et al.*, 2002). Die Folge ist eine fortschreitende Exkavation der Papille, die zu Gesichtsfeldausfällen und im Extremfall zur Erblindung führt (Abbildung 2-1).

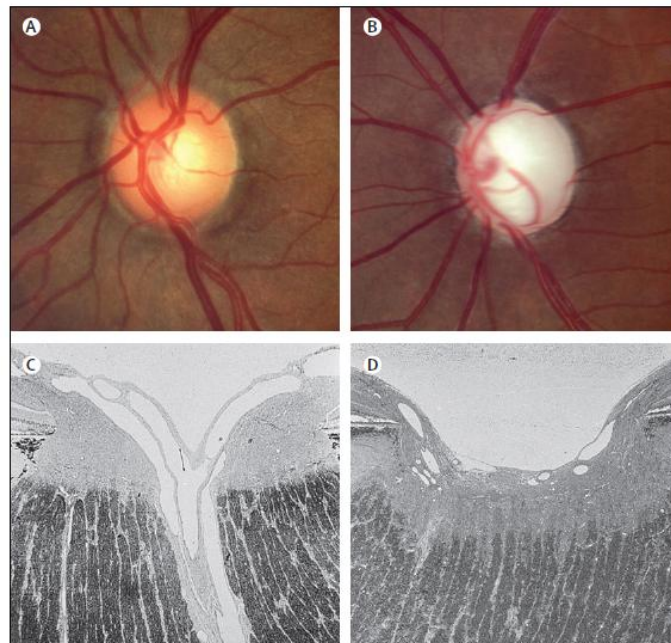


Abbildung 2-1: **Papille (Sehnervenkopf) eines gesunden (A) und eines Patienten mit POWG (B).** Histologisch ist die Exkavation der Papille (D) ebenfalls von einem nicht erkrankten Auge (C) zu unterscheiden. (modifiziert nach Quigley 2011).

Die häufigste Form dieser Erkrankung ist das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) (Augustin, 2007). Viele randomisierte und prospektive Studien zeigten, dass der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines POWGs ein erhöhter intraokulärer Druck ist (Collaborative-Normal-Tension-Glaucoma-Study-Group, 1998 a+b; Johnson *et al.*, 2000; Leske *et al.*, 2003). Um die altersabhängigen Veränderungen im Auge genauer zu erklären, werden im nächsten Abschnitt die wichtigsten betroffenen Gewebe beschrieben.

2.1 Anatomie des Auges

2.1.1 Anatomie des vorderen Augenabschnitts

Die Vorderkammer des Auges kann topographisch in drei Abschnitte unterteilt werden. Ventral ist die Kornea lokalisiert, dorsal befinden sich Iris und Linse, während sich lateral der Schlemm'sche Kanal, der Ziliarkörper und das Trabekelwerk (TW) abgrenzen lassen. Die Kornea bildet zusammen mit der Linse und der Iris als Blende den optischen Apparat. Um die Brechkraft zu gewährleisten, sind die Kornea und die Linse durchsichtig, während die Iris zur Regulation des Lichteinfalls pigmentiert ist. Das transparente Kammerwasser, welches von den Ziliarkörperfortsätzen sezerniert wird, dient unter anderem zur Ernährung der bradytrophen Gewebe des Auges und zur Aufrechterhaltung des Bulbus und fließt über das TW und den Schlemm'schen Kanal ab (Cambell, 1997).

Im Krankheitsverlauf des POWG sind vor allem pathologische Veränderungen im Bereich des Schlemm'schen Kanals und des TWs von Bedeutung (Fuchshofer und Tamm 2012).

2.1.1.1 Aufbau und Funktion des Trabekelwerks

Das TW (*Trabeculum corneosclerale*) befindet sich im sog. Kammerwinkel. Dieser wird von der Kornea und von der Iris abgegrenzt (Abbildung 2-2). Das lockere, schwammartige TW bildet zusammen mit dem ringförmigen Schlemm'schen Kanal (*Sinus venosus sclerae*) das Hauptabflussgewebe für das Kammerwasser. Es spannt sich zwischen dem Skleralsporn und der Schwalbe-Linie auf (Abbildung 2-2). Der angrenzende Schlemm'sche Kanal liegt unterhalb des TWs. Das Maschenwerk (*Reticulum trabeculare*) des TWs lässt sich in drei Abschnitte unterteilen, den inneren uvealen Teil, den tieferen korneoskleralen und den äußeren juxtakanalikulären Teil (JCT).

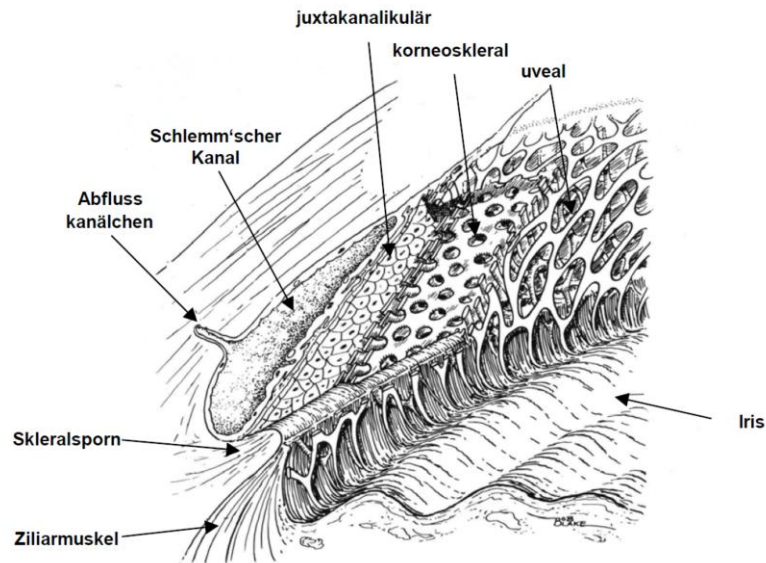


Abbildung 2-2: Kammerwinkel mit Trabekelwerk, Schlemm'schen Kanal, Iris und Ziliarkörper
(Shields und Kriegelstein, 1993)

Im uveo- und korneoskleralen Bereich befinden sich Bindegewebslamellen, die sogenannten Trabekelbalken, welche aus einem Bindegewebskern (Kollagen- und elastische Fasern) gebildet werden und vollständig von einer Schicht Trabekelendothelzellen umgeben sind. Diese sind durch Poren unterbrochen, die von außen nach innen immer enger werden. Das JCT und die subendothelialen Zellen stehen mit den im korneoskleralen befindlichen Trabekelwerkszellen in Verbindung (Lütjen-Drecoll und Rohen, 2001), bilden jedoch keine Lamellen. Hier findet sich ein für diese Region typisches lockeres Bindegewebe aus lose angeordneter fibrillärer extrazellulärer Matrix (EZM), in welches die Zellen des äußersten Bereiches des TWs eingebettet sind. Dieses Maschenwerk ist vor allem aus kollagenen und elastischen Fasern aufgebaut (Lütjen-Drecoll 1989, Acott *et al.*, 2008). Des Weiteren formen die Zellen des JCT lange zelluläre Fortsätze, welche zur Anhaftung untereinander, an die Fibrillen der dort lokalisierten EZM oder an die Endothelzellen des Schlemm'schen Kanals dienen (Tamm und Fuchshofer, 2007). Der juxtakanalikuläre Anteil bildet zusammen mit dem Endothel der Innenwand des Schlemm'schen Kanals die Region des Abflusswiderstandes und spielt für die Generierung des intraokulären Drucks (IOD) eine wichtige Rolle (Lütjen-Drecoll 1989; Ethier, 2002; Johnson, 2006).

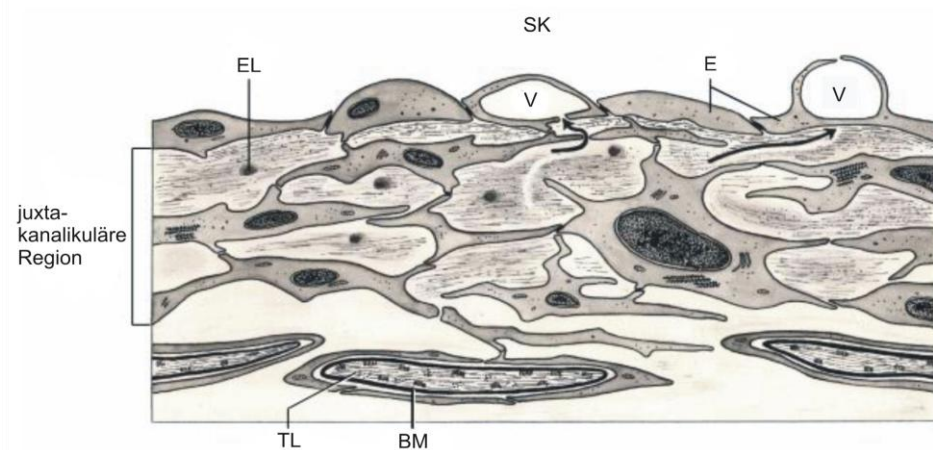


Abbildung 2-3: Darstellung der Innenwand des Schlemm'schen Kanals (SK) und der angrenzenden kribbriformen Region des Trabekelwerks (TW) (Lütjen-Drecoll *et al.*, 2001). V: Vakuolen, TL: Trabekellamellen, BM: Basalmembran, EL: elastisches Netz, E: Endothel.

Man geht davon aus, dass das juxtakanalikuläre Maschenwerk 75 % und das Endothel 25 % zum Abflusswiderstand beitragen (Grant 1963). Das Innenwandendothel des Schlemm'schen Kanals ist fenestriert und bildet große Vakuolen (Herrnberger *et al.*, 2012) (Abbildung 2-3). Diese unterbrochenen Abschnitte der Basalmembran des Innenwandendothels sind mit makroskopisch ungefüllten Bereichen des juxtakanalikulären TWs verbunden (siehe Pfeile Abbildung 2-3).

2.1.1.2 Regulationsmechanismen des Kammerwasserabflusses

Der Abfluss des Kammerwassers kann beispielsweise durch die Zusammensetzung und den Umsatz der EZM des äußeren Bereichs des Maschenwerks reguliert werden (Lütjen-Drecoll 1989; Acott *et al.*, 2008). An dieser kontinuierlichen Synthese von EZM-Bestandteilen im Bereich des JCTs sind die Trabekelwerkszellen (TWZ) beteiligt. Ebenfalls ist bekannt, dass eine Akkumulation der EZM des TWs zu einem erhöhten IOD beiträgt (Sethi *et al.*, 2011).

Des Weiteren sind der Ziliarmuskel (*M. ciliaris*) und die Eigenkontraktilität der TWZ maßgeblich an der Regulation des Abflusswiderstands beteiligt. Durch Tonusänderungen des Aktomyosinsystems kann es entweder zur Aufweitung oder Verengung des TWs kommen (Tian *et al.*, 2000; Wiederholt *et al.*, 2000). Die Kontraktion des Ziliarmuskels führt zu einer Erweiterung der Poren des inneren Anteils des TWs, wodurch der Abflusswiderstand reduziert und somit der IOD gesenkt wird (Wiederholt *et al.*, 1995; Sabanay *et al.*, 2000). Dass die Kontraktilität des TWs eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des IODs spielt, konnten

Honjo *et al.*, durch die ektopische, intravitreale oder intrakamerale Gabe von Fasudil (ROCK-Kinase Inhibitor) in Kanninchenaugen nachweisen. Dieser Inhibitor induzierte eine Depolymerisation des Aktinzytoskeletts und führte dadurch zu einer signifikanten Erniedrigung des IODs (Honjo *et al.*, 2001).

Das TW ist damit selbst aktiv an der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt. Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine Erhöhung des IODs mit einem erhöhten Abflusswiderstand korreliert (Kaufmann 1996; Moses *et al.*, 1977). Jedoch sind die molekularen Ursachen für die Generierung und Aufrechterhaltung des Abflusswiderstandes noch weitgehend unklar.

2.1.1.3 Wege und Funktion des Kammerwassers

Das Kammerwasser (*Humor aquosus*) ist eine transparente Flüssigkeit, die sich aus Elektrolyten, Proteinen und Nährstoffen zusammensetzt. Die Hauptfunktion des Kammerwassers ist die Ernährung bradytropher Strukturen der Vorderkammer, wie Kornea, Linse und TW (McLaren 2010). Weitere Aufgaben bestehen in der Aufrechterhaltung der Form des Bulbus über den IOD und der Detoxifikation des Augeninnern durch eine hohe Konzentration von Ascorbinsäure (Grehn, 2005).

Das Kammerwasser wird von den Ziliarkörperfortsätzen (*Processus ciliares*) sezerniert (2,2 µl/min) und aktiv durch Filtration und Sekretion in die hintere Augenkammer (2-4 µl/min) abgegeben. Von dort gelangt der Hauptteil (80–90 %) des Kammerwassers über die Pupille in die Region des Kammerwinkels und drainiert über das TW in den Schlemm'schen Kanal ab (siehe Abbildung 2-4).

Im episkleralen Venensystem, das über intrasklerale Sammelkanäle mit dem Schlemm'schen Kanal verbunden ist, herrscht ein Druck von etwa 7 mmHg. Der IOD beträgt im gesunden Auge um 15 mmHg. Dieses Druckgefälle wird durch den Abflusswiderstand im Bereich des JCTs aufrechterhalten.

Zusätzlich geht man von einem Effekt aus, der im „funneling“-Modell (Kamineffektmodell) beschrieben wird, wobei Verwirbelungen des Kammerwassers bei Eintritt ins TW ebenfalls zum Abflusswiderstand beitragen können (Overby *et al.*, 2009). Dieser Weg des Kammerwasserabflusses wird als konventioneller Abfluss bezeichnet (Abbildung 2-4).

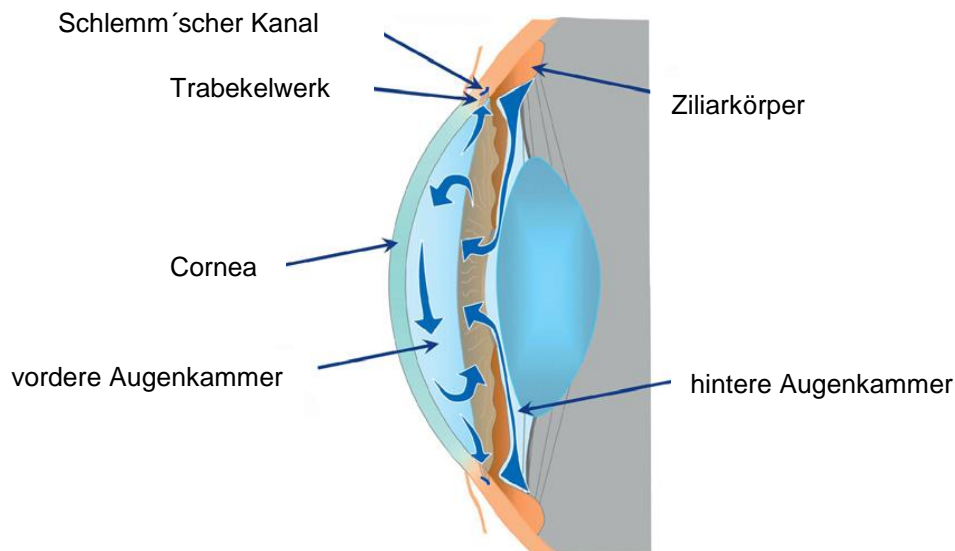


Abbildung 2-4: **Konventioneller Kammerwasserabfluss** (modifiziert nach McLaren 2010). Das Kammerwasser wird vom Ziliarepithel sezerniert, gelangt dann über aktive Transportprozesse in die hintere Augenkammer und fließt über die Pupille in den Kammerwinkel. Dort drainiert es durch das TW und den Schlemm'schen Kanal in das episklerale Venensystem.

Alternativ kann das Kammerwasser (ca. 15 %) über den uvealen Abflussweg abtransportiert werden. Hierbei gelangt das restliche Kammerwasser über Septen des Ziliarmuskels in das Gefäßsystem der Choroidea (Grehn, 2005; Kanski und Burk 2008).

2.1.2 Anatomie des hinteren Augenabschnitts

Im Hinblick auf die Pathogenese des POWG spielen in der posterioren Region des Auges vor allem die Papille und die Retina eine übergeordnete Rolle. Die Retina beinhaltet die retinalen Ganglienzellen (RGZ-Zellen), deren Axone im Krankheitsverlauf zugrunde gehen. Diese Optikus-Neuropathie definiert das POWG.

2.1.2.1 Aufbau und Funktion der retinalen Ganglienzellen

In der Netzhaut (Retina) werden Lichtreize verarbeitet und über elektrische Verschaltungen an das Gehirn weitergeleitet. Sie ist ca. 0,2 mm dick und hat einen Durchmesser von etwa 25 mm. Funktionell lassen sich in der Retina drei neuronale und zwei synaptische Zellschichten unterscheiden. Die Photorezeptoren stellen das erste Neuron dar, welche die visuellen Informationen in elektrische Signale umwandeln und an die Bipolarzellen, das zweite Neuron der Retina, weiterleitet. Die elektrischen Impulse werden schließlich über die Neurite des dritten Neurons, der retinalen Ganglienzellen, deren Axone den Sehnerv bilden und im *Corpus*

geniculatum laterale (CGL) münden, an den *Thalamus* übertragen und schließlich an die okzipitale Sehrinde übermittelt.

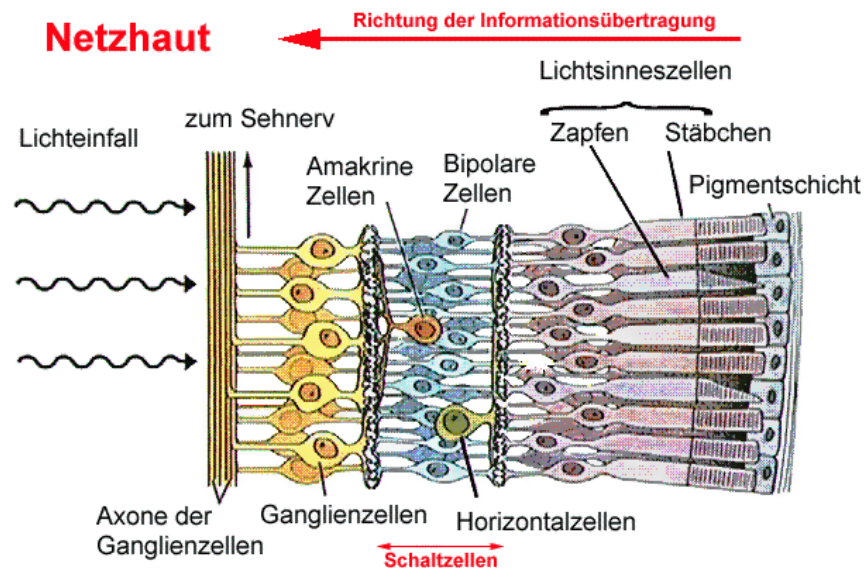


Abbildung 2-5: **Aufbau der Retina** (<http://www.egbeck.de/skripten/bilder/retina8.gif>) von außen nach innen: **retinale Pigmentepithelschicht** (RPE, *Stratum pigmentosum retinae*): Ernährung der Photorezeptoren; **Photorezeptorenschicht** (*Stratum neuroepitheliale*): 1. Neuronale Schicht, Außenglieder von Zapfen und Stäbchen; **äußere Grenzmembran** (*Membrana limitans externa*); **äußere Körnerschicht** (ONL, *Stratum nucleare externum*): 1. Neron der Sehbahn beinhaltet die Zellkörper der Photorezeptorzellen; **äußere plexiforme Schicht** (OPL, *Stratum plexiforme externum*): äußere synaptische Schicht: Axone der Amakrinen, Biopolaren und Photorezeptoren; **Innere Körnerschicht** (INL, *Stratum nucleare internum*): 2. Neuron der Sehbahn: Zellkörper der amakrinen, bipolaren und horizontalen Zellen, hier befinden sich auch die Zellkörper der Müller-Glia-Zellen (Stützzellen der Retina); **Innere plexiforme Schicht** (IPL, *Stratum plexiforme internum*): 2. synaptische Schicht besteht aus Synapsen der amakrinen Zellen und der retinalen Ganglienzellen; **Ganglienzellschicht** (GCL, *Stratum ganglionare fasciculi optici*): 3. Neuron der Sehbahn umfasst die Perikaryen der Ganglienzellen; **Nervenfaserschicht** (GFL, *Stratum neurofibrarum*): Axone der Ganglienzellen ziehen zur *Papille nervi optici* und bilden den Sehnerv, **Innere Grenzmembran** (*Membrana limitans interna*).

Diese multipolaren Neurone, die ein Bindeglied zwischen dem retinalen Sinnesepithel und dem Gehirn darstellen, befinden sich in der innersten Schicht der Retina (Abbildung 2-5). Sie variieren in ihrer Größe (10 µm bis 35 µm), der topographischen Verteilung in der Retina und der Anzahl der afferenten Neurone, mit denen die Ganglienzellen verschaltet sind (Boycott und Wässle, 1974; Peichl *et al.*, 1987a). Insgesamt befinden sich ca. 1,2 bis 1,5 Millionen RGZ-Zellen in der Retina. Diese sind hochkomplex mit den Rezeptorzellen verschaltet. Zu den photosensitiven neuronalen Zellen zählen die Stäbchen und die Zapfen, von denen etwa 125 Millionen in der menschlichen Netzhaut verteilt sind. In der *Fovea centralis* ist eine RGZ-Zelle mit 5 Photorezeptorzellen verschaltet, während in der Peripherie der

Retina in etwa 100 photosensitive Zellen mit einer RGZ-Zelle gekoppelt sind (Katz, 1985; Johnston und Wu, 1995; Kandell *et al.*, 1996; Munemasa und Kitaoka 2012). Ein Anteil der photosensitiven RGZ-Zellen trägt jedoch nicht zum Sehsinn bei. Deren Axone bilden den retinohypothalamischen Trakt zur Regelung der zirkadianen Rhythmik und münden auch in die *Area pretectalis* zur Abstimmung des Pupillenreflexes (Trepel, 2008).

RGZ-Zellen benötigen zum Überleben sogenannte neurotrophe Faktoren, die durch antero- und retrograden Transport ihre neuroprotektiven Eigenschaften übermitteln (Coxon *et al.*, 2010; Quigley *et al.*, 2000). Dies bedeutet zum einen den Transport vom Soma über das Axon Richtung Synapse (anterograd) und zum anderen vom synaptischen Ende wieder zurück zum Zellkörper (retrograd). Kommt es zu einem Mangel an neurotrophen Faktoren, wird Apoptose eingeleitet und die RGZ geht zugrunde. Durch die Expression ganglienzellspezifischer Marker wie Thy1, Neurofilament H oder NMDA-Rezeptoren kann das dritte Neuron der Sehbahn von anderen Zelltypen der Retina abgegrenzt werden (Krishnamoorthy *et al.*, 2001).

2.2 Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms

2.2.1 Pathologische Veränderungen

Das POWG ist eine selbstinduzierte Erkrankung der Retina, bei der es zu einer progressiven Degeneration von Sehnervenfaseren kommt, und die auf Dauer zur Erblindung führt. Der größte Risikofaktor für den Verlust von RGZ-Zellen ist ein erhöhter IOD. Die molekularen Ursachen sind noch weitgehend unbekannt (Tamm und Fuchshofer, 2007). Jedoch weiß man, dass der erhöhte IOD durch pathologische Veränderungen im Bereich der Kammerwasserabflussgewebe verursacht wird. Die Morphologie des Kammerwinkels ist beim POWG makroskopisch jedoch kaum verändert. Mikroskopisch lassen sich jedoch einige Umstrukturierungen erkennen. So konnten bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von glaukomatösen Augen eine vermehrte Ablagerung der die elastischen Fasern umhüllenden EZM (Plaque Material) im juxtakanalikulären TW beobachtet werden (Lütjen-Drecoll *et al.*, 1986; Lütjen-Drecoll und Rohen, 2001). Das Vorkommen dieses Plaque Materials ist mit einer gesteigerten Synthese des EZM-Bestandteils Fibronektin sowie mit einer Erniedrigung der für den EZM-Abbau verantwortlichen Metalloproteinasen assoziiert (Babihayev *et al.*, 1989; Acott *et al.*, 1992) und korreliert mit dem Ausmaß des axonalen Schadens in der Papille (Gottanka *et al.*, 1997). Bradley *et al.* beschrieben,

dass es nach Perfusion mit Metalloproteinasen von menschlichen Organkulturen zu einem erniedrigten Abflusswiderstand kommt (Bradley *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass die EZM-Veränderungen im Bereich der Innenwandregion zu einer modulierten Zellrigidität in den Trabekelzellen führt. Eine erhöhte Steifheit dieser Zellen, verursacht durch Modifikationen im Zytoskelett, würde zur Steigerung des Abflusswiderstands beitragen (Raghunathan *et al.*, 2013). Das Aktin-Zytoskelett spielt eine tragende Rolle bei der Regulation des IODs, so werden zurzeit maßgeblich neue Therapien für das Glaukom gesucht, die eine Modulation des Zytoskeletts verursachen. Die Behandlung mit Latrunculin, einem Gift der Schwammgattung *Latrunculia*, das Aktin an der Polymerisierung hindert, konnte die Abflussrate des Kammerwassers steigern, wodurch der IOD gesenkt wurde (Okka *et al.*, 2004). Durch ektopische, intravitreale oder intrakamerale Gabe von Fasudil, einem ROCK-Inhibitor, konnte der IOD ebenfalls signifikant reduziert werden (Honjo *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der Umsatz der EZM und die Modulation des Aktin-Zytoskeletts zu einem großen Anteil an den pathologischen Veränderungen, welche für einen erhöhten Abflusswiderstand im Bereich des juxtakanalikulären Maschenwerks des TWs, verantwortlich sind.

Insgesamt betrachtet führen die pathologischen Modulationen im Bereich des vorderen und hinteren Augenabschnitts zum Verlust von RGZ-Zellen, wodurch die für das POWG charakteristischen Skotome verursacht werden (Guo *et al.*, 2005; Fuchshofer 2011; Zode *et al.*, 2011). Die molekularen Zusammenhänge, die dieses Phänomen verursachen, sind allerdings noch weitgehend unbekannt (Tamm und Fuchshofer, 2007). Jedoch gibt es einige Hinweise auf pathogenetische Mediatoren, die hier anscheinend eine Schlüsselrolle einnehmen. Unsere Arbeitsgruppe konnte beispielsweise durch die Linsen-spezifische Überexpression des Connective Tissue Growth Factors (CTGF), einem Downstream Mediator des Transforming Growth Factors $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$), das weltweit erste Tiermodell für das POWG mit allen Charakteristika entwickeln (Junglas *et al.*, 2012).

2.2.2 Molekulare Hintergründe

2.2.2.1 Transforming Growth Factor- $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$)

In Eukaryoten sind bisher drei Isoformen, TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ und TGF- $\beta 3$, detektiert worden. Sie werden von unterschiedlichen Genen codiert, sind strukturell sehr ähnliche, hoch konservierte Proteine und werden ubiquitär exprimiert und sezerniert.

Diese Art der Polypeptide sind ca. 13 kDa groß und ihre biologische Aktivität entfaltet sich als Homodimer. Ihre Synthese ist abhängig anhand des Entwicklungsstadiums und der Art des Gewebes. TGF- β 2 ist die im Auge am stärksten exprimierte Isoform von TGF- β . Diese Isoform kommt im gesunden Auge in zahlreichen Geweben vor (Pfeffer *et al.*, 1994; Cousins *et al.*, 1991; Granstein *et al.*, 1990, Jampel *et al.*, 1990). Es wird angenommen, dass TGF- β 2 vom Ziliarkörperepithel und der Linse exprimiert und von dort in das Kammerwasser sezerniert wird (Helbig *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1998; Gordon-Thomson *et al.*, 1998; Wallentin *et al.*, 1998). Des Weiteren stellte sich bei *in vitro*-Versuchen heraus, dass auch TWZ in der Lage sind sowohl den Wachstumsfaktor als auch seine Rezeptoren zu bilden und in das Kammerwasser abzugeben (Tripathi *et al.*, 1993 a + b; Tripathi *et al.*, 1994). Physiologisch spielt diese Isoform wahrscheinlich eine große Rolle beim Aufbau des Immunprivilegs des Auges (Streilein, 1999; Streilein *et al.*, 1997).

In Anbetracht der Pathogenese des POWGs wird aufgrund zahlreicher Analysen vermutet, dass TGF- β 2 ein Schlüsselfaktor ist der zu glaukomatösen Veränderungen führt. Der Wachstumsfaktor wurde sowohl vermehrt im Kammerwasser als auch in reaktivierten Astrozyten des Sehnervs bei der Mehrheit von POWG Patienten in deutlich erhöhten Konzentrationen vorgefunden (Tripathi, 1994, Picht *et al.*, 2001; Inatani *et al.*, 2001, Ochiai und Ochiai 2002; Yamamoto *et al.*, 2005; Fuchshofer und Tamm 2012). Dies scheint jedoch spezifisch für das POWG zu sein, da bei anderen Glaukomformen wie dem Pseudoexfoliationsglaukom keine gesteigerte Konzentration von TGF- β 2 nachweisbar ist. Hier ist eine andere Isoform von TGF- β , TGF- β 1 prominent (Djordjevic-Jocic *et al.*, 2012). Weiterhin ist TGF- β 2 an zahlreichen fibrotischen Erkrankungen des Organismus, welche mit pathologischen Veränderungen der EZM einhergehen, beteiligt (Baghy *et al.*, 2012; Brenner, 2009, Godwin und Jenkins 2009). TGF- β 2 führte beispielsweise *in vitro* in TWZ zu einer gesteigerten Ablagerung von EZM-Bestandteilen (Fuchshofer *et al.*, 2007; Fuchshofer *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2000; Welge-Lüssen *et al.*, 2000). Auch nach Perfusion des TWs mit TGF- β 2 in Organkulturen ließ sich eine vermehrte Ablagerung von Fibronectin vermerken, was mit einem gesteigerten IOD korreliert (Gottanka *et al.*, 2004, Fleenor *et al.*, 2006). Umgekehrt konnte beobachtet werden, dass der Anstieg des IODs eine Induktion des Wachstumsfaktors impliziert (Guo *et al.*, 2005), was zu der Annahme führt, dass TGF- β 2 an der Bildung des im glaukomatösen Auge des JCTs festgestellten Plaque Materials beteiligt sein könnte. Diese Hypothese wird

durch Versuche bekräftigt, in denen der Plaminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) durch TGF- β 2 so beeinflusst war, dass ein Abbau der EZM verhindert wurde (Fuchshofer *et al.*, 2003). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass TGF- β 2, neben fibrotischen Effekten, auch Einfluss auf das Aktinzytoskelett nehmen kann. So belegen Studien, dass es nach Behandlung von TWZ mit dem Wachstumsfaktor zu einer vermehrten Synthese glatt-muskulären α -Aktins kommt, was eine gesteigerte Formation von Aktin-Stressfasern und eine erhöhte Kontraktilität verursachte und durch die kleine GTPase RhoA vermittelt wurde (Tamm *et al.*, 1996, Nakamura *et al.*, 2002). Diese Aspekte im Hinblick auf das POWG und das Wissen, dass TGF- β 2 an zahlreichen fibrotischen Erkrankungen beteiligt ist, macht diese Wachstumsfaktoren so interessant.

2.2.2.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Die fibrotischen Effekte von TGF- β können durch die Bone Morphogenetic Proteine 7 und 4, welche auch *in situ* im TW und im Sehnervenkopf synthetisiert werden, blockiert werden (Wordinger *et al.*, 2002; Fuchshofer *et al.*, 2007). Innerhalb der BMP-Familie sind etwa 20 Proteine bekannt (Urist *et al.*, 1965). Die bioaktive Form der BMPs sind Dimere und werden als Vorläuferproteine sezerniert. Sie umfassen sieben Cystein-Reste. Sechs davon bilden einen Cysteinknoten. Das siebte Cystein wird für den Kontakt zu einem zweiten BMP-Monomer benötigt, wodurch es zu der funktionell wichtigen Dimerisierung kommt (McDonald *et al.*, 1993; Scheufler *et al.*, 1999). BMP4 und BMP7 sind im Auge an der Entwicklung der Linse und der Netzhaut beteiligt (Trousse *et al.*, 2001; Furuta *et al.*, 1998; Jena *et al.*, 1997). Auch wird postuliert, dass BMPs neben ihren normalen Gewebefunktionen auch neuroprotektive Eigenschaften besitzen und das Wachstum von Dendriten von RGZ-Zellen fördern können (Nonner *et al.*, 2001; Ueki und Reh, 2012).

Da BMP4 und -7 das Potenzial besitzen, die vermehrte TGF- β induzierte Expression von EZM zu unterbinden und diese Proteine, wie TGF- β , in allen POWG relevanten Geweben exprimiert werden, rücken die BMPs in der Pathogenese des POWGs ebenfalls in den Fokus (Fuchshofer *et al.*, 2007; Wordinger *et al.*, 2007). Gremlin, ein spezifischer BMP-Inhibitor, führte durch die Inhibition von BMP7 zu einer erhöhten Expression von Fibronektin und Kollagen Typ III und konnte durch TGF- β in der diabetischen Niere induziert werden (Murphy *et al.*, 2008). Eine Studie von Zode *et al.* beschreibt ähnliche Wechselwirkungen zwischen den Wachstumsfaktoren. So konnten beispielsweise die durch eine heterozygote Defizienz von BMP4

verursachten Fehlbildungen im Bereich des Sehnervs durch Blockierung der fibrotischen Effekte von TGF- β 2 anhand der Gabe von Gremlin revertiert werden (Zode *et al.*, 2009). Ein weiterer Hinweis auf die molekularen Zusammenhänge der TGF- β -Superfamilie zugehörigen Proteine findet sich in einer Studie an Osteoblasten. Hier konnte festgestellt werden, dass die Signalantwort von BMP7 durch eine TGF- β 1 abhängigen Induktion von Faktoren wie beispielsweise dem Ski-related novel protein N (SnoN) unterdrückt wurde (Ehnert *et al.*, 2012). Jedoch können TGF- β und die BMPs auch synergistische Effekte aufweisen, was beispielsweise bei der Ausdifferenzierung mit Knochenmarksstammzellen *in vitro* gezeigt wurde (Khu *et al.*, 2008). Im Hinblick auf das Glaukom ist aber vor allem die Beobachtung interessant, dass Gremlin nach Perfusion von Organkulturen menschlicher Augenvorderkammern eine Erhöhung des IODs bedingte (Wordinger *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass dieser BMP-Inhibitor auch in erhöhten Konzentrationen aus dem Kammerwasser im glaukomatösen Auge vorkommt (Wordinger *et al.*, 2007) und ein enger Zusammenhang der Wirkmechanismen zwischen den BMPs und TGF- β besteht, unterstreicht die Rolle der BMPs im Krankheitsverlauf des POWGs.

2.2.2.3 Signalkaskade von TGF- β und BMPs

Als molekularer Schalter zwischen TGF- β 2 und BMP7 konnte das inhibitorische Smad7 Protein identifiziert werden (Fuchshofer *et al.*, 2009). Dieser Gesichtspunkt ist sehr interessant, da bekannt ist, dass die Wirkung von TGF- β und der BMPs hauptsächlich über einen Rezeptor-vermittelten Signalweg, der Smad-Signalkaskade, übertragen wird und analog verläuft (Shi *et al.*, 2003; Heldin *et al.*, 1997) (Abbildung 2-6). Der Name Smad leitet sich von dem bei Drosophila gefundenen Protein MAD (Mothers against Decapentaplegic) und dem Caenorhabditis elegans Protein SMA (Small body size) ab. Die für eine aktive Signalisierung benötigten Signalmoleküle und die jeweiligen spezifischen Rezeptoren werden alle in den vom POWG betroffenen Geweben exprimiert (Liu *et al.*, 2012, Hocking *et al.*, 2009, Obata *et al.*, 1999; You *et al.* 1999, Helbig *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1998; Gordon-Thomson *et al.*, 1998; Wallentin *et al.*, 1998). Die Rezeptor-Liganden werden als sogenannte Prä-Proproteine synthetisiert. Ihre Pro-Domänen ermöglichen die Bildung von Dimeren. Die Dimere werden von Pro-Protein-Konvertasen gespalten und anschließend als reife Liganden-Homodimere sezerniert (Dubois *et al.*, 1995). Die BMPs gehören ebenso wie TGF- β zur TGF- β Superfamilie

und sind etwa 30-38 kDa groß (Miyazawa *et al.*, 2002). Als Signalmoleküle lösen sie zahlreiche Zellvorgänge wie Proliferation, Migration, Differenzierung, apoptotische Vorgänge und der embryonalen Entwicklung aus (Schmierer *et al.*, 2007). Dies zeigt die hohe Biodiversität in der Signalgebung der TGF- β /BMP-Signaltransduktionswege.

Die jeweiligen Isoformen von TGF- β und der BMPs binden dann zuerst an den zellmembranständigen TGF- β - bzw. BMP-Rezeptor II (T β -RII bzw. BMP-RII). Nun kann der TGF- β - /BMP-Rezeptor I (T β -RI / BMP-RI) rekrutiert werden. Im Folgenden wird T β -RI / BMP-RI von der konstitutiven Kinaseaktivität des T β R-II / BMP-RII phosphoryliert (Alevizopoulos und Mermoud, 1997). Dieser hetero-tetramere Rezeptorkomplex löst nun eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Smads aus (Massague *et al.*, 2005). Die Rezeptor-aktivierten Smads2 und 3 (Lagna *et al.*, 1996; Macias-Silva *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996) bilden eine Untergruppe der Smads (Derynck und Zhang, 1996) und wirken als Mediatoren von TGF- β sowie von Activin. Die BMP-Proteinfamilie induziert die Phosphorylierung von Smad1, -5 und -8 (Zwijsen *et al.*, 2003). An die aktivierten Transkriptionsfaktoren bindet nun, unabhängig der TGF- β - oder BMP-Signalkaskade, Co-Smad4. Der Komplex transloziert in den Nukleus um dort die Transkription bestimmter Zielgene zu regulieren (Zhang und Derynck, 1999; Chen *et al.*, 2004; Zode *et al.*, 2007).

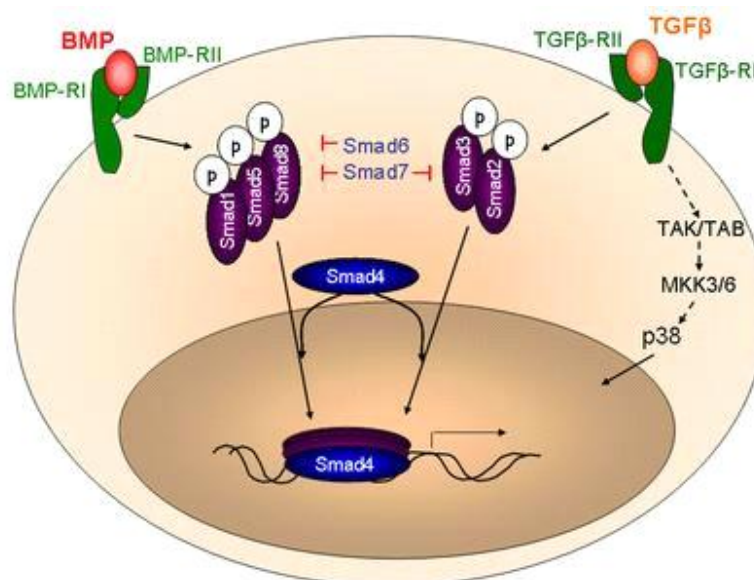


Abbildung 2-6: **Smad-Signalkaskade nach Aktivierung durch TGF- β und BMPs** (Smeland E., Oslo University Hospital).

Um dieses System in einem Gleichgewicht zu halten, wirken inhibitorisch dazu Smad6 und -7. Durch deren Bindung an die membranständigen Rezeptoren oder an die phosphorylierten Smads kann der aktivierte TGF- β -/BMP-Signalweg negativ moduliert werden (Hayashi *et al.* 1997, Nakao *et al.*, 1997; Topper *et al.*, 1997). Die Expression von Smad6 und -7 wird wiederum durch TGF- β , Activin und BMP selbst induziert. Smad7 unterdrückt die Aktivierung beider Signaltransduktionswege, jedoch ist Smad7 vor allem für die negative Rückkopplung des TGF- β Signalweges verantwortlich (Fuchshofer *et al.*, 2009). Eine Möglichkeit der Selbstregulation des BMP-Signalwegs ist durch Smad6 gegeben (Kang *et al.*, 2012).

Ein Zielgen der TGF- β Signalkaskade ist CTGF. Die Überexpression dieses Faktors führte *in vivo* zur Ausbildung eines POWGs (Junglas *et al.*, 2012), was darauf hindeutet, dass CTGF eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des POWGs einnimmt.

2.2.2.4 Connective Tissue Growth Factor (CTGF)

CTGF, auch CCN2 genannt, wird zur CCN-Proteinfamilie gezählt und ist 1991 als zweites Mitglied dieser Proteinfamilie identifiziert worden (Bradham *et al.*, 1991; Brigstock *et al.*, 2003). Die ersten drei identifizierten Proteine der CCN-Familie, Cyr61, CTGF und Nov, sind Namensgeber (Bork, 1993). Insgesamt umfasst die CCN-Familie sechs Mitglieder: CCN1/Cyr61, CCN2/CTGF, CCN3/NOV, CCN4/WISP-1, CCN5/WISP-2 und CCN6/WISP-3. Bei den CCN-Proteinen handelt es sich um sekretierte Proteine. Sie sind mit der EZM assoziiert und regulieren zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Überleben, sowie viele biologische Prozesse wie Angiogenese, Chondrogenese, Wundheilung, Tumorgenese (Brigstock, 2003). Auch sind diese Zytokine in der Pathogenese fibrotischer und vaskulärer Krankheiten involviert (Blom *et al.*, 2002). CTGF beinhaltet die genetische Information aus 5 Exons und 4 Introns und ist beim Menschen auf Chromosom 6q23.1 lokalisiert (Martinerie *et al.*, 1992). Die codierenden Bereiche tragen die Information für ein N-terminales Signalpeptid zur Ausschleusung des translatierten Proteins aus der Zelle. Dieser Wachstumsfaktor setzt sich aus 4 stark konservierten Domänen zusammen (Grotendorst *et al.*, 1996), und ist zwischen 36 und 38 kDa groß (Bradham *et al.*, 1991) (Abbildung 2-7).

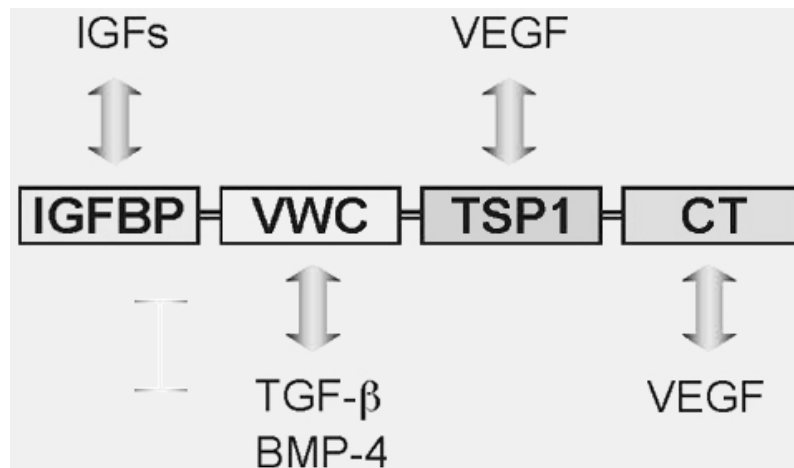


Abbildung 2-7: **Organisation des CTGF Proteins in vier Domänen** (Lau *et al.*, 1999). **IGFBP**: Insulin-like Growth Factor binding domain; **VWC**: von Willebrand Factor Type 1C repeat domain; **TSP1**: Thrombospondin type 1 repeat domain; **CT**: carboxy-terminal domain.

Die erste Domäne umfasst die Region des Insulin-like Growth Factor Bindeproteins (IGFBP), während sich bei der zweiten Domäne Motivhomologien mit dem von Willebrand Faktor Typ 1C (VWC-C) zeigen (Bork, 1993). Durch dieses „chordin-like cystein-rich“ Motiv des VWC können TGF- β und Proteine der BMP-Familie gebunden werden (Abreu *et al.*, 2002). Die dritte Domäne enthält ein Thrombospondin Typ 1 (TSP1) umfassendes Motiv. Durch adhäsive Eigenschaften dieser Domäne können hier Proteine wie das „LDL Receptor related“ Protein (LRP) (Segarini *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2003), Integrine, Heparansulfat-Proteoglykane (Gao *et al.*, 2004) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Inoki *et al.*, 2002) gebunden werden. Die VEGF-Domäne bildet die vierte Domäne. Durch sie besitzt CTGF die Fähigkeit, eine Bindung mit Heparin einzugehen (Brigstock *et al.*, 1997). So kann CTGF beispielsweise Heparansulfat-Proteoglykane als Rezeptoren an der Zelloberfläche nutzen (Chen *et al.*, 2001) oder in der EZM immobilisiert werden (Kireeva *et al.*, 1997).

Im Hinblick auf das POWG hat sich gezeigt, dass CTGF ein Schlüsselmulator ist (Junglas *et al.*, 2012). Im anterioren Bereich des Auges wird CTGF in TWZ und den Zellen des Schlemm'schen Kanals nachgewiesen. Darüber hinaus findet man CTGF auch in der Region des Ziliarmuskels und im Irissphinkter (Liang *et al.*, 2003). Weiterhin gehört dieser Wachstumsfaktor zu einem der am stärksten exprimierten Proteine im TW (Tomarev *et al.*, 2003) und kommt im Kammerwasser vor (Ho *et al.*, 2005). Die Feststellung, dass CTGF in erhöhten Konzentrationen im Kammerwasser von Patienten mit Pseudoexfoliationsglaukom vorkommt (Browne *et al.*, 2011) und

als „Downstream“ Mediator von TGF- β (Grotendorst *et al.*, 1997; Leask und Abraham, 2004; Junglas *et al.*, 2009) vor allem auf die Expression von Proteinen der EZM und der Organisation des Aktinzytoskeletts wirkt (Heusinger-Ribeiro *et al.*, 2001), macht diesen Wachstumsfaktor so interessant. So zeigen beispielsweise Astrozyten der *Lamina cribrosa*, nach Knockdown von CTGF und darauffolgender Behandlung mit TGF- β 2, keine weitere Ablagerung von Komponenten der EZM (Fuchshofer *et al.*, 2005). CTGF kann aber auch direkt, unabhängig von TGF- β 2, die Umstrukturierung der EZM stimulieren (Junglas *et al.*, 2009).

Die Relevanz von CTGF auf das Aktomyosinsystem konnte die Arbeitsgruppe von Rao bestätigen. Die Inhibition der Rho Kinase verursachte *in vitro* eine verminderte Expression von CTGF. Sie konnten ebenfalls eine durch CTGF vermittelte Induktion von Neuromedin U, einem strukturell konservierten Neuropeptid, nachweisen. Neuromedin U ist involviert an den kontraktilen Eigenschaften glattemuskulären Gewebes (Iyer *et al.*, 2012). Außerdem wurde in unserer Arbeitsgruppe festgestellt, dass CTGF *in vitro* die Fähigkeit hat, die Formation von Aktin-Stressfasern zu fördern und die Kontraktilität von TWZ zu steigern. Eine durch den Wachstumsfaktor vermittelte erhöhte Aktivität des RhoA/Rock-Signalwegs war hierfür verantwortlich (Junglas *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass die induktiven Eigenschaften von monomerem Aktin auf die Proteinmenge von CTGF durch eine „CARG like box“ in der Promotorregion von CTGF vermittelt wird (Muehlich *et al.*, 2006). Des Weiteren kann die Translation von CTGF *in vitro* in TWZ durch Behandlung mit TGF β -1 und durch eine Erhöhung des IOD gesteigert werden (Chudgar *et al.*, 2006). Weitere extrazelluläre Stimuli, die die Expression von CTGF neben TGF β erhöhen, sind auch der Hypoxie-induzierte-Faktor (HIF-1) (Kroening *et al.*, 2009) und Angiotensin. Auch gibt es Hinweise darauf, dass CTGF mit den BMPs wechselwirken kann. So zeigten Versuche mit Chondrozyten, dass es zu einer direkten Interaktion von CTGF mit BMP2 kommt (Maeda *et al.*, 2008).

In vivo konnte unsere Arbeitsgruppe durch die Linsen-spezifische Überexpression von CTGF eine in der Region der Kammerwasserabflusswege veränderte Zusammensetzung der EZM sowie eine gesteigerte Expression von smooth muscle- α Aktin im Bereich des TWs feststellen. Diese Modifikationen waren mit einem signifikant erhöhten IOD und einem damit einhergehenden sukzessiven Verlust der Axone im Sehnerv assoziiert. Der in diesem Tiermodell beobachtete gesteigerte IOD konnte durch den Einsatz von Fasudil, einem ROCK-Inhibitor, normalisiert werden

(Junglas *et al.*, 2012). Dies impliziert, dass CTGF maßgeblich an der Modulation des Aktin-Zytoskeletts und damit an der Kontraktionsrate der TWZ im Kammerwasserabflussgewebe beteiligt ist, was die tragende Rolle von CTGF in der Pathogenese des POWGs verdeutlicht (Junglas *et al.*, 2012).

Ingesamt kann festgestellt werden, dass all diese Wachstumsfaktoren ein homöostatisches Gleichgewicht formen, das beim POWG gestört sein könnte. Auf der einen Seite BMP7 und BMP4 und auf der anderen Seite TGF- β und CTGF. Eine weitere Aufklärung über das Zusammenspiel von TGF- β , BMPs und CTGF würde dazu beitragen, die molekularen Hintergründe in der Pathogenese des POWGs zu verstehen und bei der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen zu helfen. CTGF scheint dabei der kritische Faktor zu sein. Dies bedeutet, dass CTGF als Schlüsselmolekül zu einer Disbalance des homöostatischen Gleichgewichts beitragen könnte, was letztlich zu den in der CTGF-Überexpressionsmaus beschriebenen glaukomatösen Veränderungen führen könnte (Junglas *et al.*, 2012).

2.3 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es, mittels des in unserem Labor generierten Mausmodells für das POWG, aufzuklären, inwieweit die in dieser Maus durch CTGF-Überexpression bereits publizierten glaukomatösen Veränderungen auf einen direkten oder indirekten Effekt von CTGF zurückzuführen sind. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob die permanente Überexpression von CTGF einen Einfluss auf die homöostatische Balance zwischen TGF- β und den BMPs hat.

Um dies zu untersuchen, wurden folgende Techniken verwendet:

- Analyse zwei Monate alter CTGF-Überexpressionsmäuse:
 - Western Blot und quantitative Real-Time RT-PCR Analyse zur Identifikation des Effekts von CTGF auf den BMP- und TGF- β -Signalweg
 - Kontrolle der im oben genannten Punkt gewonnenen Daten über immunhistochemische Färbungen
- *In vitro*-Versuche an HTM-N-Zellen mit dem BMP-Inhibitor Noggin zur Bestimmung des Einflussgrades auf die BMPs

-
- Inhibition des RhoA/ROCK- und des MEK/Erk-Signalwegs zur Aufklärung der CTGF vermittelten Effekte auf den TGF- β -Signalweg
 - Intravitreale Injektionen zur Klärung der Frage ob der Niedergang der Axone im Sehnerv direkt oder indirekt von CTGF beeinflusst wird
 - Injektion von rekombinantem CTGF und BMP7
 - Effekte der rekombinanten Proteine im NMDA-Schadensmodell
 - *In vivo*- und *in vitro*-Experimente zur Prüfung der Auswirkungen von CTGF auf die Viabilität der RGZ unter Normal- und Stressbedingungen
 - Quantitative Real-Time RT-PCR und Western Blot Analysen zur Identifikation des Effektes von CTGF auf die Expression von neurotrophen Faktoren
 - Einfluss von CTGF auf neurotrophe Faktoren im Bereich der Papille mittels immunhistochemischer Färbung

3 Material und Methoden

Die nachfolgend beschriebenen Techniken sind in unserer Arbeitsgruppe etabliert und sind bereits in mehreren Arbeiten aufgezeigt worden. Deshalb kann es in den Beschreibungen der Methoden zu Ähnlichkeiten kommen.

3.1 Materialliste

3.1.1 Reagenzienliste

Bezeichnung	Bezugsquelle
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
1,4-p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
10 x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol (DPM-30)	Roth, Karlsruhe
2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride (DDSA)	Roth, Karlsruhe
Azeton	Merck, Darmstadt
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10% (w/v)	Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagenz A+B	Interchim, Wörl, AUS
Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Borat (Natriumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
Casyton	Roche/Innovatis, Bielefeld
CDP-Star	Roche, Penzberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie® Brillant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Connective Tissue Growth Factor	Selbstaufreinigung
DEPEC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Qiagen, Hilden

DL-Dithiothreitol, min. 99 % Titration	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Dodecylsulfat (Na ₂ -Salz)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dorsomorphin	Enzo, Lörrach
EDTA	Roth, Karlsruhe
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fasudil (HA-1077)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälber Serum (FKS)	Life Technologies, Paisley, UK
Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaraldehyd, 25 % in Wasser	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycidether 100	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidin HCl	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin	Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen
Luminata Forte Western HRP.	Millipore Corporation, Billerica, USA

Magermilchpulver (MM)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Methanol	Merck, Darmstadt
Mek1/2-Inhibitor (UO126)	Bioline, Luckenwalde
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
N-Metyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Noggin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Life Technologies, Paisley, UK
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Paisley, UK
peqGold TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phosphataseinhibitor-Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Quercetin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti®-Free Stripping -Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid-stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCl)	Merck, Darmstadt
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Staurosporin	ALEXIS Biochemicals, Farmingdale, USA

SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tergitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NL
Transforming Growth Factor 2 (TGF-β2)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tris Ultrapure, MB Grade	USB Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Life Technologies, Paisley, UK
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser Rotisolv (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylencyanol FF	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

Tabelle 3-1: Reagenzienübersicht

3.1.2 Enzyme und Reagenzien-Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Hot Star Taq Kit	Qiagen, Hilden
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
MTT Reagenz	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Selbsterstellung
TUNEL Assay	Promega, Mannheim

Tabelle 3-2: Enzyme und Reagenzien-Kits

3.1.3 Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'	Position
BDNF	<i>Mus musculus</i>	forward	agtctccaggacagcaaagc	613 – 633
BDNF	<i>Mus musculus</i>	reverse	tgcaaccgaagtatgaaataac c	685 – 707

BMP4	<i>Mus musculus</i>	forward	gatctttaccggctccagtct	681 – 701
BMP4	<i>Mus musculus</i>	reverse	tgggatgttctccagatgttc	801 – 821
BMP7	<i>Mus musculus</i>	forward	cgagaccttccagatcacagt	782 – 802
BMP7	<i>Mus musculus</i>	reverse	caccaagaagagctccgact	835 – 854
CNTF	<i>Mus musculus</i>	forward	ttgattccacaggcacaaaa	42 – 61
CNTF	<i>Mus musculus</i>	reverse	ccctgcctgactcagaggt	85 – 103
CTGF	<i>Homo sapiens</i>	forward	ctcctgcaggctagagaagc	884 – 903
CTGF	<i>Homo sapiens</i>	reverse	gatgcacttttgccttctt	957 – 977
FGF2	<i>Mus musculus</i>	forward	tgcttgagttgtagttgacg	392 – 371
FGF2	<i>Mus musculus</i>	reverse	cggctctactgcaagaacg	421 – 439
GDNF	<i>Rattus norvegicus</i>	forward	ctaagatgaagttatgggatgtc g	322 – 345
GDNF	<i>Rattus norvegicus</i>	reverse	cttcgagaagcctcttaccg	72 – 91
GNB2L	<i>Homo sapiens</i>	forward	gctactaccccgcagttcc	170 – 188
GNB2L	<i>Homo sapiens</i>	reverse	cagtttccacatgatgatggtc	220 – 241
GNB2L	<i>Mus musculus</i>	forward	tctgcaagtacacggtccag	514 – 533
GNB2L	<i>Mus musculus</i>	reverse	gagacgatgatagggttgctg	584 – 604
Gremlin	<i>Mus musculus</i>	forward	gaccacggaagtgcaga	141 – 159
Gremlin	<i>Mus musculus</i>	reverse	ccctcagctgttggcagtag	211 – 230
LEDGF	<i>Mus musculus</i>	forward	ggccagcagtaagacaaagc	1765 – 1784
LEDGF	<i>Mus musculus</i>	reverse	tgaagctgccgacctagttat	1836 – 1851
LEDGF	<i>Rattus norvegicus</i>	forward	caagcaggaggaacaaatg	1042 – 1061
LEDGF	<i>Rattus norvegicus</i>	reverse	cttctggcttcttcttcac	1082 – 1103
NTF-3	<i>Mus musculus</i>	forward	cgacgtccctggaaatagtc	183 – 202
NTF-3	<i>Mus musculus</i>	reverse	tggacatcacctgttcacct	239 – 259
PEDF	<i>Rattus norvegicus</i>	forward	ggactctgatctcaactgfcaag	893 – 914
PEDF	<i>Rattus norvegicus</i>	reverse	aagtctgggtcaccgtcag	842 – 861
TGF- β 1	<i>Homo sapiens</i>	forward	gcagcacgtggagctgta	1362 – 1379
TGF- β 1	<i>Homo sapiens</i>	reverse	cagccggttgctgaggta	1408 – 1425
TGF- β 1	<i>Mus musculus</i>	forward	tggagcaacatgtggaactc	1358 – 1377
TGF- β 1	<i>Mus musculus</i>	reverse	gtcagcagccggttacca	1413 – 1430
TGF- β 2	<i>Homo sapiens</i>	forward	ccaaagggtacaatgccaac	1194 – 1213

TGF- β 2	<i>Homo sapiens</i>	reverse	cagatgcttctggatttatggtatt	1283 – 1307
TGF- β 2	<i>Mus musculus</i>	forward	tcttccgcttgcaaaacc	1670 – 1687
TGF- β 2	<i>Mus musculus</i>	reverse	gtgggagatgtaagtctttgga	1738 – 1760
RPL32	<i>Rattus norvegicus</i>	forward	atctgttttgcgcatcat	35 – 53
RPL32	<i>Rattus norvegicus</i>	reverse	ttccgccagtttcgctta	93 – 110
Smad2	<i>Mus musculus</i>	forward	aggacggttagatgagcttgag	607 – 628
Smad2	<i>Mus musculus</i>	reverse	gtcccaaatttcagagcaa	682 – 701
Smad3	<i>Mus musculus</i>	forward	tcaagaagacggggcagtt	442 – 460
Smad3	<i>Mus musculus</i>	reverse	ccgaccatccagtgcct	522 – 539
Smad6	<i>Mus musculus</i>	forward	gttgcaaccctaccacttc	1817 – 1836
Smad6	<i>Mus musculus</i>	reverse	ggaggagacagccgagaata	1873 – 1892
Smad7	<i>Mus musculus</i>	forward	cccaatggattttctcaaacc	2233 – 2253
Smad7	<i>Mus musculus</i>	reverse	gggccagataattcgttcc	2300 – 2318

Tabelle 3-3: Übersicht über die für die quantitative Real-Time RT-PCR verwendeten Primer

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
β B1	<i>Mus musculus</i>	forward	ggaagtgccagctcatcag
β B1	<i>Mus musculus</i>	reverse	gtgcgggacagaaacctg
SV40	<i>Mus musculus</i>	forward	gtgaaggaaccttacttctgtggtg
SV40	<i>Mus musculus</i>	reverse	gtccttgggggtcttctacctttctc

Tabelle 3-4: Übersicht über die bei der Genotypisierung verwendeten Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden über die Firma Life Technologies (Paisley, UK) bezogen und mittels Universal Probe Library Assay Design Center (Roche, Applied Science, Penzberg) konstruiert.

Für die Bestimmung der PCR-Produkthöhe der genotypisierten β B1-Tiere mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kam der GeneRuler 100 bp DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zum Einsatz.

3.1.4 Antikörper und Proteinstandard

Protein	Primärantikörper	Bezugsquelle
α -Tubulin	rabbit	Rockland, Gilbertsville, USA
BDNF	rabbit	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
BMP4	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
BMP7	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
CNTF	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
CTGF	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Gremlin	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
NTF-3	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
pSmad1/5/8	rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
pSmad2	rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
pSmad3	rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Smad7	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TGF- β 1	rabbit	Promega, Mannheim
TGF- β 2	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Tabelle 3-5: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Sekundärantikörper	Bezugsquelle
Alexa Fluor [®] 488-konjugierte donkey-anti-goat	Life Technologies, Paisley, UK
Alexa Fluor [®] 488-konjugierte goat-anti-rabbit	Life Technologies, Paisley, UK
AP-konjugierte chicken-anti-goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
AP-konjugierte chicken-anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Cy [™] 3 konjugierte goat-anti-rabbit	Dianova, Hamburg
Cy [™] 3 konjugierte donkey-anti-goat	Dianova, Hamburg
HRP-konjugierte rabbit-anti-GAPDH	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
HRP-konjugierte chicken-anti-goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HRP-konjugierte chicken-anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HRP-konjugierte chicken-anti-rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

Tabelle 3-6: Übersicht über die eingesetzten Sekundärantikörper

Die beiden obenstehenden Tabellen zeigen alle für die Western Blot Analysen bzw. die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörper.

Bei den Proteinanalysen wurde das Molekulargewicht der detektierten Banden mit Hilfe des Proteinmolekulargewichtmarkers PageRuler Prestained Protein-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

3.1.5 Rezepte für Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
4 x Auftragspuffer für Agarosegel	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 15 % (w/v) Ficoll
3 % Magermilchpuffer (MM-Puffer)	3 % Magermilchpulver 0,1 % Tween In 0,1 M Phosphatpuffer
Cacodylatpuffer	20,14 g Cacodylsäure, in 0,5 l H ₂ O dest. pH 7,2
Coomassie-Entfärber	500 ml Methanol 10 ml Essigsäure mit dH ₂ O lösen; ad 1 l
Coomassie-Färbelösung	40 ml Methanol 2 ml Essigsäure 0,2 g Coomassie-Brilliant Blue R-250 mit dH ₂ O auffüllen, ad 100 ml
0,2 % Cold Water Fish Gelatine (CWFG)	0,1 % Triton X 0,2 % CWFG 1 % BSA in 0,1 M Phosphatpuffer (Php)
Detektionspuffer, pH 9	15,76 g 0,1 M Tris/HCL (pH 6,8) 5,84 g 0,1 M NaCl mit dH ₂ O lösen; ad 1 l
Einfriermedium	55 ml DMSO 10 ml 100 %-iges FBS

	35 ml DMEM 4500
10 x Elektrodenpuffer	250mM Tris/HCl 400mM Glycin 1% (w/v) SDS in dH ₂ O lösen; ad 1 l
EM-Fixans	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Epon-Ansatz	Stammlösung A:Stammlösung B im Verhältnis 1:1 + 2 % DMP-30 Beschleuniger
MTT Lösung	20 mg MTT 4 ml PBS 16 ml serumfreies DMEM
MTT Solvent	24,85 ml DMSO 150 µl 100 % Essigsäure 2,5 g SDS
Paraphenylendiamin	500 mg Paraphenylendiamin 50 ml Ethanol
PBS, 10x, pH 7,4	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 4,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ mit dH ₂ O ad 1 l, autoklavieren
Proteinase K Lysepuffer	50 mM KCL 10 mM Tris HCL (pH 8,3) 2 mM MgCl ₂ 0,1 mg/ml Gelatine 0,45 % (v/v) Nonidet P-40 0,45 % (v/v) Tween 20 Kurz vor Gebrauch: Zugabe von 50 µl Proteinase K (20 mg/ml)
0,1 M Phosphatpuffer (Php), pH 7,4	100 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O auf pH 7,4 auf 0,1 M mit dH ₂ O verdünnen

10 % (w/v) SDS-Lösung	10 g SDS in dH ₂ O lösen; ad 100 ml
4x SDS Lämmli-puffer	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 10 % β-Mercaptoethanol
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1% (w/v) SDS in dH ₂ O lösen; ad 1 l
4x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,3M DTT bzw. 10 % β-Mercaptoethanol
Stammlösung A (Epon)	62 ml Glycidether 100 100 ml DDSA
Stammlösung B (Epon)	100 ml Glycidether 100 89 ml MNA
10x TBE	108 g Tris 55g Borat 40 ml EDTA (0,5 M), pH 8 in dH ₂ O lösen; ad 1 l
10x TBS, pH 7,4	30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid mit dH ₂ O ad 1 l, autoklavieren
1x TBST	100 ml 10x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 mit dH ₂ O ad 1 l
10x Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Methanol

	3,7 ml 10% (w/v) SDS in dH ₂ O lösen, ad 1 l
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8	121,14 g Tris in dH ₂ O lösen; ad 1 l
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	181,71 g Tris in dH ₂ O lösen; ad 1 l
Waschpuffer für Proteinisolation	0,3 M Guanidin HCL in 95 % Ethanol lösen
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA 100 ml Php unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4

Tabelle 3-7: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

3.1.6 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Casy Zellzähler	Roche/Innovatis, Bielefeld
Einbettautomat EM TP	EM TP Leica, Wetzlar
35-Gauge-Injektionskanüle	W.P.I., Berlin
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Hamiltonspritze, 25 µl	Roth, Karlsruhe
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
IKA combimag RET Heizplatte	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kryo-Einfriergerät	Nunc, Roskilde, DEN
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg

Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Microm HM 500 OM Kryostats	Microm International, Walldorf
Mikroskop Axio Imager. Z1, mit ApoTome Zusatzmodul	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	TechnoStar, Deutschland
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop-2000c	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, NED
Pipettierhilfe Macroman TM	Gilson, Den Haag, NED
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Power Supply	Consort, Turnhout, BEL
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Roller mixer SRT2 stuart [®]	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stemi 2000-CS Binokular	Carl Zeiss, Göttingen
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, AUT
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Durchlichtschirm	Bachhofer Laboratoriumsgerät, Reutlingen
Ultracut E-Ultramikrotom	Reichert-Jung, Kirchseeon
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 3-8: Geräteübersicht

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
3MM Blotting ("Whatman") –Papiere	Neolab, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
CellScraper (Zellschaber)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dispomed Einmalspritze	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
EasyFlasks Nunclon™ Δ T25, T75	Nunc, Roskilde, DEN
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DEN
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Microlance Kanülen	BD Bioscience, Heidelberg
Microseal® „B“ Film	Biorad, München
Multidishes Nunclon™ Δ 6-well	Nunc, Roskilde, DEN
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Ohrmarken	Hauptner & Heberholz, Solingen
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96 well iCycler IQ	Biorad, München
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Powderfree Sempercare Handschuhe	Sempermed, Wien, AUT
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Rotilabo 0,22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht

Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun, Wertheim
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tissue Culture Plate 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 3-9: Übersicht der Verbrauchsmaterialien

3.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.1 Gewinnung genomischer DNA

Genomische DNA bezeichnet man gemeinhin als die Gesamtheit aller Gene eines Organismus. Sie ist im Zellkern lokalisiert und liegt bei Säugetieren als Chromosomensatz vor. Genomische DNA wird vornehmlich aus Blutzellen, Gewebestücken oder kultivierten Zellen isoliert (Mühlhardt, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde genomische DNA mittels Schwanzspitzenbiopsie der jeweiligen zu untersuchenden Mäuse isoliert, um den Genotyp der Tiere bestimmen zu können. Hierfür wurden die Tiere mit Isofluran betäubt. Zur Wiedererkennung der jeweiligen Mäuse erhielten diese zusätzlich eine nummerierte Ohrmarke. Die Lyse der etwa 0,5 cm großen Gewebestücke erfolgte anschließend in 200 µl Aufschlusspuffer inklusive Proteinase K (vgl. Tabelle 3-7) über Nacht (ü.N.) bei 55 °C und 1.200 Upm im Schüttler. Nach vollständiger Auflösung des Gewebes wurde die Proteinase K für 15 min bei 95 °C inaktiviert. Durch Zentrifugation bei 10.000 Upm für 10 min wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert. Nachdem der DNA-haltige Überstand anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde, konnte er als Template für die nachfolgende Genotypisierungs-PCR-Analyse eingesetzt werden.

3.2.2 PCR-Analysen zur Genotypisierung der β B1-Tiere

Die klassische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine etablierte Methode zur technischen Vermehrung von DNA. Sie findet zahlreiche Anwendung in der Forschung bis hin zur Diagnostik. Diese Enzym-basierte Technik geht zurück auf Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986) und lässt sich in drei Schritte unterteilen: dem Denaturierungs-, Annealing- und dem Elongationsschritt. Der erste Schritt findet bei 94 °C statt. Anschließend findet eine Abkühlung auf eine den Oligonukleotidprimern angepasste Temperatur (ca. 55 °C) statt. Dies dient zur Hybridisierung der Primer an die zuvor

aufgeschmolzene und nun einzelsträngige DNA. Bei 72 °C erreicht die DNA-Polymerase ihr Optimum, was bedeutet, dass es im letzten Schritt der PCR zu einem Verlängern der Oligonukleotidprimer kommt. Ergebnis hiervon ist eine Kopie der Template DNA. Pro Zyklus kommt es hierdurch zu einer Verdopplung der DNA (Mülhardt, 2009).

Die Genotypisierung der β B1-CTGF-Mäuse erfolgt mittels spezifischer Primer für die SV40- und die β B1-Region (Tabelle 3-4). Die im Konstrukt eingeführte SV40-Region dient der Stabilisierung der zu überexprimierenden mRNA, und kommt daher auch nur in den transgenen Tieren vor. Die Primer für β B1 binden innerhalb des Promotor-Sequenzabschnitts, der dem CTGF codierenden Bereich vorgelagert ist. Dies ermöglicht eine zweite spezifische Bestimmung des Genotyps.

Die Ansätze für die Polymerasekettenreaktionen (PCRs) wurde nach den in Tabelle 3-10 dargestellten Pipettierschemen und den spezifischen Primern der jeweils zu amplifizierenden DNA hergestellt. Dabei ist zu erwähnen, dass bei der β B1- und der SV40-PCR eine Taq-DNA-Polymerase aus eigener Herstellung verwendet wurde.

Mausschwanz-PCR (15 μl)		
	βB1	SV40
Genomische DNA	1,2 μ l	2 μ l
10x PCR-Puffer	1,5 μ l	1,5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	0,6 μ l	0,3 μ l
dNTPs (10mM)	0,3 μ l	0,3 μ l
Primer fw (10 μ M)	0,3 μ l	0,3 μ l
Primer rev (10 μ M)	0,3 μ l	0,3 μ l
Taq DNA Polymerase	0,3 μ l	0,15 μ l
Glycerol	-	3 μ l
H ₂ O	10,5 μ l	7,15 μ l

Tabelle 3-10: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR

Die in Tabelle 3-11 aufgeführten Cycler-Programme sind speziell an die Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer und die Amplikonlänge angepasst worden.

Genotypisierungs-PCR Cyclerprogramme				
Produkt	βB1		SV40	
	360 bp		300 bp	
	°C	Dauer	°C	Dauer
1. Schritt	96 °C	2 min	94 °C	2 min
2. Schritt	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec
3. Schritt	65 °C	30 sec	55 °C	30 sec
4. Schritt	72 °C	20 sec	72 °C	45 sec
5. Schritt	72 °C	2 min	72 °C	5 min
6. Schritt	10°C	∞	10 °C	∞
Zyklen (2-5)	35 x		35 x	

Tabelle 3-11: Thermocyclerprogramme für die SV40- und βB1-Genotypisierungs-PCR

Die amplifizierten Proben, die noch kein Glycerol enthalten hatten, wurden mit 3 µl eines Auftragspuffers versetzt. Das Amplikon wurde anschließend über ein Ethidiumbromid-Agarosegel (siehe Punkt 3.2.3) analysiert.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Untersuchung der durch PCR vervielfältigten DNA erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Dies ist die simpelste und effektivste Methode, linearisierte DNA-Fragmente zwischen 0,5 und 25 kb aufzutrennen und zu analysieren (Mülhardt, 2009). Hierfür wurden 0,8 mg Agarose in TBE-Puffer eingewogen. Durch das Aufkochen mittels Mikrowelle konnte die in Pulverform befindliche Agarose gelöst werden. Anschließend wurde der Agarose-TBE-Puffer-Mischung 4 µl Ethidiumbromid (EtBr) in einer Endkonzentration von 50 ng/ml beigemischt. Das im Agarosegel befindliche EtBr (roter Phenanthridin-Farbstoff) interkaliert dabei mit doppelsträngiger DNA, wodurch die DNA-Fragmente nach erfolgreicher Auftrennung unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbar gemacht werden können.

Für die Identifizierung des Genotyps der verwendeten Tiere wurden 15 µl von jedem PCR-Ansatz inklusive Auftragspuffer in die dafür vorhergesehen Taschen eines 1 %-igen Agarosegels geladen. Als Referenz wurde ebenfalls 1,5 µl eines Standard-DNA-Markers in eine Geltasche aufgetragen. Die eigentliche Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von ca. 110 V für 40 min durchgeführt. Die Detektion der amplifizierten DNA wurde anschließend mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms bei einer Wellenlänge von 302 nm erreicht.

3.3 Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time RT-PCR

3.3.1 Prinzip der quantitativen Real-Time RT-PCR

In den *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen wurde zur quantitativen Analyse der relativen Expression ausgewählter Gene eine der modernsten Arten der PCR, die sog. quantitative Real-Time RT-PCR (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996) genutzt. Hier dient, anders als bei der herkömmlichen PCR, „complementary“-DNA (cDNA), die aus RNA revers transkribiert wurde, als Ausgangsmaterial für die Polymerasekettenreaktion. Bei dieser Form der DNA-Amplifikation wird die exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes kontinuierlich, Fluoreszenz-basiert, gemessen (Higuchi *et al.*, 1993). Vorteil dieser Technik ist, dass eine Aussage über kleinste cDNA Konzentrationen gemacht werden kann (Fraga, Meulia und Fenster, 2008). Zur Visualisierung dient ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Früher wurde hierfür Ethidiumbromid verwendet (Mühlhardt, 2009). Dieser wird heute durch andere Farbstoffe wie SYBR-Green I ersetzt. Grund hierfür ist ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis (Mühlhardt, 2009). In den PCR-Produkten kann SYBR-Green I durch einen Laser angeregt und die Intensität der emittierten Fluoreszenz über einen Detektor verfolgt werden. Die Namensgebung der „Echtzeit“-PCR liegt der Eigenschaft des fluoreszierenden Farbstoffes zugrunde. SYBR-Green I lagert sich ausschließlich in doppelsträngige DNA ein. Dabei ist die Fluoreszenz proportional zur vorhandenen DNA-Menge. Ungebunden leuchtet SYBR-Green I nur sehr schwach. So kann das entstehende Produkt schon während der PCR, also in „Echtzeit“, sichtbar gemacht werden. Der Wert, bei dem die Fluoreszenz den Hintergrundwert überschreitet, wird „cycle-threshold“ (C_T) genannt. Dies gibt den Schwellenwert an, ab dem die exponentielle Zunahme des Produkts analysiert werden kann. In späten Zyklen der PCR kommt es zu einer Sättigungsphase, was unter anderem durch den Verbrauch der Primer und der Nukleotide verursacht wird (Mühlbauer 2009). Ab diesem Zeitpunkt kommt es zu keiner weiteren Verdopplung der cDNA. Deshalb wird der C_T -Wert als Richtwert verwendet. So können Rückschlüsse auf die ursprünglich eingesetzte mRNA-Menge gemacht werden (Roche, 2003; Roche, 2001). Am Ende der PCR-Kinetik wird eine Schmelzkurve erstellt. Primerdimere, die möglicherweise als Nebenprodukt entstehen, können so abgegrenzt werden. Im Unterschied zur qualitativen Quantifizierung wird das zu analysierende Gen in seiner Expression bei

der quantitativen Prüfung zu einem Referenzgen in Verhältnis gesetzt. Als Referenzgen eignen sich „Housekeeping“-Gene, die sich in ihrem Expressionsniveau möglichst wenig verändern (Mühlhardt, 2009).

Die für die quantitative Real-Time RT-PCR benötigten Primer werden über Exon-Intron-Grenzen des Zielgens gelegt. Hierdurch soll vermieden werden, dass eine eventuelle DNA-Kontamination mit amplifiziert wird. Außerdem sichert dies eine spezifische Anreicherung der zu kontrollierenden cDNA. Die Sequenzen der Primer wurden mit Hilfe des Primerdesign-Programms von Roche (www.roche-applied-science.com) kreiert.

3.3.2 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA aus den behandelten Zellen und den Mäusaugen wurde die „single-step“ Methode von Chomczynski verwendet (Chomczynski *et al.*, 1987). Guanidinisothiocyanat inaktiviert und denaturiert Proteine und somit auch die RNAsen. Dieses chaotrope Salz ist in dem zum Aufschluss der Zellen verwendeten peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz enthalten. Die peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz ist eine einphasige Lösung, in der neben Guanidinisothiocyanat noch Phenol zu finden ist. Phenol dient zur Degradation der aus den Zellkomponenten gelösten DNA und dem Entfernen der Proteine (Mühlhardt, 2009). Durch Hinzufügen von Chloroform wird das Homogenat dann in drei Phasen aufgetrennt. Der wässrige Überstand enthält die RNA, welche mit Hilfe von Isopropanol ausgefällt wird. Im Detail wurden zur Isolation folgende Schritte durchgeführt: Die Zellen bzw. das Gewebe wurden in 500 µl peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz gegeben. Danach wurde das Zelllysate in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (Schritt entfällt bei Isolation aus Geweben), mit 140 µl pro 500 µl peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und für 2–3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13200 Upm. Danach wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zur Fällung der RNA mit Isopropanol (Verhältnis 1:1) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Pelletierung der RNA erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 13200 Upm. Die sedimentierte RNA wurde dann in 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 4 °C und 13200 Upm ein weiteres Mal zentrifugiert. Abschließend wird der Überstand quantitativ verworfen und die RNA 5

min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei –80 °C gelagert.

3.3.3 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels NanoDrop-2000c Spectrophotometer (Peqle Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Hierfür wurde jeweils 1 µl der RNA vermessen. Die RNA-Konzentration wurde durch die Multiplikation der Extinktion (260 nm) mit dem Methodenfaktor RNA (40 µg/ml) und dem RNA-Verdünnungsfaktor errechnet. Um die Reinheit der RNA bestimmen zu können, wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen RNase-freies Wasser ermittelt. Nur die RNA mit einem Quotienten von E_{260}/E_{280} zwischen 1,8 und 2,0 wurde als rein betrachtet. Diese RNA wurde für die Herstellung von cDNA weiterverwendet.

3.3.4 cDNA-Herstellung

Der essentielle Schritt zur cDNA Herstellung ist die reverse Transkription. Durch diese können beispielsweise Retroviren ihre genetische Information in die DNA des Wirtes integrieren. Das zuständige Enzym hierfür heißt Reverse Transkriptase (Modrow, Falke, Truyen und Schätzl, 2010), und wird auch bei der Herstellung von cDNA verwendet. RNA ist im Gegensatz zu DNA aufgrund der in der Umgebung vorkommenden RNAsen nicht so stabil konserviert (Mühlhardt, 2009). Die cDNA erhält die Informationen die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren. Vorteil ist, dass sich cDNA in PCR-Techniken analysieren lässt. Für die cDNA-Synthese wird die „messenger“-RNA (mRNA) benötigt. Die Codierung der zu translatierenden Proteine ist auf diesem RNA-Typ gespeichert. Um hauptsächlich die mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren, wurden als Primer oligo-dT-Ketten gewählt. Für die reverse Transkription wurde das „iScript cDNA Synthese Kit“ (BioRad, München) verwendet. Dabei kam eine reverse Transkriptase ohne RNase-Aktivität zum Einsatz. Um mögliche DNA-Kontaminationen der RNA abgrenzen zu können, wurden pro RNA eine positive (+RT) und eine negative Probe (-RT) hergestellt. Die „+RT“ enthält die cDNA, während sich in der „-RT“ nur die Ausgangs-RNA befindet. Der negative Ansatz wurde ohne Enzym in die reverse Transkription eingespeist. Es wurden pro Probe 0,5 µg RNA eingesetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 7,5 µl aufgefüllt. Dann wurden 2 µl „5x iScript™ Reaction Mix“ und 0,5 µl der „iScript™ Reverse Transcriptase“ zu den positiven Ansätzen gegeben. Die negativen

Kontrollen wurden mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Zur cDNA-Synthese wurden die Proben für 5 min bei 25 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 42 °C revers abgeschrieben. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase für 5 min bei 85 °C inaktiviert. Bis zur Weiterverarbeitung in der quantitative Real-Time RT-PCR Analyse wurde die fertige cDNA bei -20 °C für gelagert.

3.3.5 Durchführung der quantitativen Real-Time RT-PCR

Die Abschätzung der Effekte von CTGF auf die relative Expression der Komponenten des BMP/TGF-β-Signalwegs sowie auf Inhibitoren von TGF-β und der BMPs erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real-Time RT PCR. Ebenfalls wurde diese Technik verwendet, um festzustellen, inwieweit CTGF die Expression neurotropher Faktoren beeinflusst.

Hierzu wurden Proben untersucht, die sowohl durch *in vivo* als auch durch *in vitro* Versuche gewonnen wurden. Die aus diesen Zell- bzw. Gewebeextrakten synthetisierte cDNA fungierte als Ausgangsmaterial (vgl. 3.3.4). Bei diesen Untersuchungen wurden die PCR-Produkte mittels SYBR-Green I detektiert. Zur Normierung der relativen Quantifizierung dienten die „Housekeeping“-Gene des Guanin-nucleotid-bindenden Proteins (GNB2L) und des ribosomalen Proteins L32 (RPL32).

Die Genexpressionsanalyse erfolgte in einer 96-Well Mikrotiterplatte. Jede cDNA-Probe wurde in Triplikaten untersucht. Um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA erkennen zu können, wurden zusätzlich die „-RT“-Ansätze (vgl. 3.3.4) und eine Probe aus RNase-freiem Wasser untersucht.

Zuerst wurden 0,3 µl der zu untersuchenden Proben zum Master Mix gegeben. Der Master Mix wurde unter Vorgabe des HotStart Taq Kit (Qiagen) angefertigt. In die vorher definierten Wells werden 10 µl des jeweiligen Gemisches (siehe Tabelle 3-12) pipettiert. Danach werden 5 µl Primer-Mix (0,17 µl forward, 0,17 µl reverse Primer (0,1 M) und 4,66 µl RNase-freies Wasser zugefügt. Die Primer sind spezifisch für das zu untersuchende Gen. Insgesamt kommt man pro Well auf ein Reaktionsvolumen von 15 µl.

Reaktionsansatz 1x (15 µl)	
cDNA	0,3 µl
10 x PCR-Puffer	2,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	0,8 µl
dNTPs (25mM)	0,16 µl
Sybr-Green I	0,39 µl
Fluorescein	0,02 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl
H ₂ O	11,25 µl
Primermix	5 µl
Primer-Mix	
H ₂ O	60,5 µl
Primer forward (1 µM)	1 µl
Primer reverse (1 µM)	1 µl

Tabelle 3-12: Bestandteile für einen „+RT“/„-RT“/H₂O-Master-Mix-Ansatz

Vor der Amplifikation der cDNA mit Hilfe des iQ5 Multicolor Realtime-PCR Detection iCycler Systems (BioRad, München) wurde die Mikrotiterplatte mit einer speziellen Klebefolie (Microseal[®] „B“ Film, BioRad, München) abgedichtet und kurz abzentrifugiert. Zur Analyse der relativen Genexpression wurde ein „two-step“-Programm verwendet: Anfangs musste die hier eingesetzte Hot Star Taq DNA Polymerase 15 min bei 95 °C aktiviert werden. Im zweiten Schritt wurde die cDNA für 10 s bei 95 °C aufgeschmolzen. Das Annealing der Primer und die Amplifikation erfolgte für 40 s bei 60 °C. Schritt zwei und drei wurden 50 x wiederholt. Danach wurde nochmals 1 min auf 95 °C und dann 1 min auf 55 °C erhitzt. Die Detektion der Schmelzkurven erfolgte 6 s lang für 81 Zyklen bei 55 °C + 0,5 °C je Zyklus.

3.3.6 Auswertung und Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe der *iCycler-iQ-Optical-System-Software* Vers. 3.0a (Biorad, München) erhoben. Die Berechnung der relative Expression resultiert aus der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Die Auswertung der numerischen Daten sowie deren graphische Darstellung erfolgte mittels Microsoft[®] Excel (Microsoft[®] Corporation, Redmond, USA). Der „Student's“ T-Test wurde zur Ermittlung von statistisch signifikanten Ergebnissen herangezogen. Als statistisch signifikant wurde $p \leq 0,05$ und statistisch hoch signifikante Unterschiede als $p \leq 0,01$ angesehen.

3.4 Biochemische Arbeitstechniken

3.4.1 Proteinpräparation

Die Aufreinigungsmethode über peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz beinhaltet einen wichtigen Vorteil: Nach Extraktion der RNA aus HTM-N-Zellen und den anterioren bzw. posterioren Bereichen der Mauseugen, bestand die Möglichkeit aus der verbleibenden Inter- und Phenol-Chloroform-Phase (Chomczynski, 1993) die Gesamtproteine aus den jeweiligen Proben zu gewinnen. Hierfür wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 750 µl Isopropanol pro 500 µl TriFast™-Reagenz auf verbleibenden Phenol–Chloroform–Phase geben
- 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Protein-Pellet 3x mit 1 ml Waschpuffer (0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % ETOH) für jeweils 20 min bei RT spülen
- Jeweils 5 min bei 4 °C und 7600 g zentrifugieren
- Protein Pellet mit 1 ml 95 %igem EtOH 20 min bei RT waschen
- 5 min bei 4 °C und 7600 g zentrifugieren
- Überstand quantitativ abnehmen und restliches EtOH bei RT verdampfen lassen
- Protein-Pellet je nach Größe in 150 – 200 µl 1 % SDS-Lsg. + Protease-(1:1000) + Phosphatase-Inhibitor (1:100) aufnehmen
- Pellet über Nacht bei 50 °C bei 750 Upm im Schüttler lösen
- Zentrifugation 10 min bei 4 °C und 10000 x g
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen

Bis zur weiteren Verwendung in den Western Blot Analysen wurden die so extrahierten Proteine bei -20 °C gelagert.

3.4.2 BCA-Assay

Die Proteinkonzentration des isolierten Gesamtproteins der *in vitro* und *in vivo* Experimente wurden mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt.

Bei diesem Test wird sich der Methode der chemischen Reduktion bedient. Es kommt im alkalischen Milieu zur Ausbildung von Cu^{2+} -Komplexen mit den vorhandenen Proteinen, welche dann eine Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{1+} zur Folge haben. Der Gehalt des reduzierten Kupfers ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen Proteins. Um nun die Konzentration der Proteinprobe messen zu können, nimmt man die Bicinchoninsäure zur Hilfe. Diese ermöglicht das Beobachten der Reduktion des Kupfers unter alkalischen Bedingungen, indem sie violette Komplexe mit Kupfer (I) bildet, die durch Messung bei einer optischen Dichte von 560 nm nachgewiesen werden können. Dies bedeutet, dass der Proteingehalt bei dieser Technik indirekt sichtbar gemacht wird (Smith *et al.*, 1985). Eine Standardverdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin dient als Eichkurve: Hierfür wurde eine Stammlösung aus Rinderserumalbumin (2 mg/ml) mit 1 % SDS auf 1000, 750, 500, 250, 100, 20 µg/ml eingestellt.

Zur eigentlichen Messung wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte verwendet. Zuerst wurden 10 µl der jeweiligen Standardkonzentrationen pipettiert. Als Referenzprobe dient 1 % SDS. Die Proteinproben wurden unverdünnt und in einer 1:5 bzw. 1:10 Verdünnung, mit einem Endvolumen von ebenfalls 10 µl, auf die Platte aufgetragen. Nach der Herstellung eines Mastermixes der BCA-Lösung wurden alle zuvor pipettierten Wells mit 200 µl einer nach Herstellerangaben angefertigten Reagenzlösung versetzt. Jeder Ansatz wurde dabei in Duplikaten angesetzt. 30 min nach Inkubation bei 37 °C wurde die Proteinkonzentration mit einem ELISA-Reader (Sunrise-Basic, Tecan, AUS) bei einer Extinktion von 560 nm photometrisch vermessen. Der Gehalt der Proteine lässt sich anschließend mit Hilfe der Eichgeraden und den Mittelwerten der Einzelmessungen ermitteln.

3.4.3 Western Blot Analyse

3.4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor der Western Blot Analyse mussten die Gesamtproteine im SDS-Gel mittels Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) aufgetrennt werden. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese nach Vermessung der Proteinmenge zunächst auf eine einheitliche µg-Menge (15 bzw. 20 µg) eingestellt, mit 4 x Lämmli-Auftragspuffer versetzt, für 5 min im Wasserbad denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Die im SDS-Laemmli-puffer enthaltenden Reagenzien Dithiothreitol (DTT) und β-Mercaptoethanol reduzieren die Disulfidbrücken in den Polypeptidketten, wodurch

die Proteine vollständig denaturiert werden. Zusätzlich führt SDS (Sodium Dodecyl Sulfat), eine anionische Detergens, zu einer Linearisierung und zu einer negativen Entladung der Proteine. Aufgrund dieser Eigenschaften können die Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht voneinander separiert werden. Die für die Gelelektrophorese benötigten SDS-Polyacrylamidgele wurden ebenfalls nach der Methode von Laemmli angefertigt (Laemmli, 1970).

	Sammelgel	Trenngel 10%	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %
Proteingröße		> 130 kD	35 – 130 kD	< 35 kD
dH₂O	0,68 ml	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml
Rotiphorese® Gel30	0,17 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml
Tris/HCl, 1M, pH 6,8	0,13 ml	-	-	-
Tris/HCl, 1,5M, pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% APS	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der SDS-Gele

Zur Herstellung eines SDS-Gels wurde eine Apparatur der Firma PeqLab Biotechnology GmbH verwendet. Nachdem der Aufbau nach Anleitung erfolgte, wurde zuerst ein Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit 300 µl Isopropanol überschichtet. Dies dient der Sicherung einer planen Oberfläche des Trenngels. Der Prozentsatz des zu verwendenden Trenngels richtet sich hierbei nach dem Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins (Tabelle 3-13). Das Sammelgel wird nach Polymerisation des Trenngels vorbereitet, und nach Abgießen des Isopropanols auf das bereits feste SDS-Gel pipettiert. Um den Auftrag der Proben auf das Sammelgel zu gewährleisten, musste noch ein Plastikkamm in das flüssige Gel hinzugefügt werden, um Taschen im Gel zu erzeugen. Das fertige Gel wurde nach Anleitung in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank

mit 1 x Laufpuffer (Elektrodenlaufpuffer) aufgefüllt. Zur Feststellung der jeweiligen Molekularmasse wurden, zusätzlich zu den Proben, 5 µl eines Proteinmolekulargewichtsmarkers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in die Geltaschen geladen.

Die Auftrennung der Proteine in dem vorher hergestellten Zwei-Phasen-Gel gelingt nach der Theorie der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (Luttmann, 2006):

Das Sammelgel hat die Funktion, die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel zu fokussieren bzw. „zu sammeln“, damit die Auftrennung der zu untersuchenden Proteine gemeinsam startet. Der im Sammelgel verwendete Puffer besitzt einen pH-Wert von 6,8 und enthält Chloridionen. Die Chloridionen (Leitonen) wandern im elektrischen Feld schneller als die Proteine. Das im Elektrodenpuffer (siehe Tabelle 3-7) vorkommende Glycin (Folgeionen) ist allerdings bei einem pH-Wert von 6,8 weitestgehend ungeladen. Deshalb kommt es beim Übergang von Sammel- zu Trenngel zu einer Region hoher elektrischer Spannung, was zu einer Aufkonzentration der Proteine in diesem Bereich führt. Dem Trenngel liegt eine höhere Quervernetzung des Polyacrylamids zugrunde, wodurch die Fokussierung der Proteine verloren geht. Der pH-Wert des Trenngels liegt bei 8,8. Dies bewirkt, dass die Glycinionen negativ geladen sind und schneller wandern können als die Proteine. Diese werden nun nach ihrer molekularen Masse bei 20 mA (pro Gel) für 1 h und 15 min aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel verworfen.

3.4.3.2 Semidry Blotting

Nach erfolgter Separation der Proteine mittels Molekularmasse werden die aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel elektrophoretisch auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Hierfür wurde eine „Semidry Blotting“-Apparatur von Peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen) verwendet.

Die PVDF-Membran und fünf Whatman-Filterpapiere wurden für den „Semidry-Blot“ auf die Größe des Trenngels gebracht, um einen Kurzschluss beim Transfer der Proteine zu vermeiden. Zur Aktivierung wird die PVDF-Membran kurz mit Methanol getränkt, und anschließend 5 min mit Transferpuffer äquilibriert. Die benötigten Filterpapiere wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet. Der Blot wurde folgendermaßen zusammengebaut:

Aufbau Semidry Blot
Kathode (-)
2 Lagen Whatman-Papier
Trenngel mit Proteinen
PVDF-Membran
3 Lagen Whatman-Papier
Anode (+)

Tabelle 3-14: Aufbau Semidry Blot

Es wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden. Geblottet wurde für 1,5 h bei 25 V.

3.4.3.3 Nachweis spezifischer Proteinbanden

Nachdem die Proteine mittels Semidry-Blot auf die PVDF-Membran transferiert wurden, konnten nun spezifische Proteinbanden nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Membran zuerst für 1 h bei RT mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) in TBST (Tabelle 3-15) inkubiert. Dieser Vorgang wird als Blockierung bezeichnet, dient dazu unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und somit die Sensitivität des Western-Blots zu erhöhen. Zur eigentlichen Detektion des relevanten Proteins wurde, nach Entfernung der Blockierungslösung, ein spezifischer Primärantikörper (Tabelle 3-15) in einer 0,5 %-igen BSA in TBST-Lösung verdünnt zur Membran gegeben. Der Western-Blot wird auch als Immuno-Blot bezeichnet. Daraus lässt sich schließen, dass der primäre Antikörper mit dem entsprechenden Antigen einen Komplex eingeht. Da es sich hierbei um eine „indirekte Markierung“ des Proteins handelt, wurde noch ein zweiter Antikörper benötigt. Der sogenannte Sekundärantikörper bindet den zuvor entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex und ist entweder mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder der Alkalischen-Phosphatase (AP) gekoppelt. Diese Enzyme besitzen die Eigenschaft, ein entsprechendes Substrat zu katalysieren. Das entstandene Produkt kann beispielsweise durch Lumineszenz nachgewiesen werden und ist relativ zur Ausgangs-Proteinmenge.

Im Detail wurden die Membranen 1 h nach erfolgter Blockierung über Nacht bei 4 °C mit der primären Antikörperlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen. Das Einwirken des HRP- bzw. AP-konjugierten Sekundärantikörpers erfolgte 1 h bei RT. Anschließend wurde nochmals

dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Die Membran wurde durchwegs geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen zu gewährleisten.

Protein	Blockierungslösung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
BDNF	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:500 in 0,5 % BSA/TBST	HRP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
BMP4	5 % BSA/TBST	Anti-goat 1: 500 In 0,5 % BSA/TBST	HRP-konjugierte chicken-anti-goat 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
BMP7	5 % BSA/TBST	Anti-goat 1: 500 In 0,5 % BSA/TBST	AP-konjugierte chicken-anti-goat 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
CNTF	5 % BSA/TBST	Anti-goat 1: 500 In 0,5 % BSA/TBST	AP-konjugierte chicken-anti-goat 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
CTGF	5 % BSA/TBST	Anti-goat 1: 1000 In 0,5 % BSA/TBST	AP-konjugierte chicken-anti-goat 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
Gremlin	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:200 in 0,5 % BSA/TBST	HRP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
NTF-3	5 % MM/TBST	Anti-rabbit 1:500 in 0,5 % MM/TBST	AP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
pSmad 1/5/8	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:1000 in 0,5 % BSA/TBST	AP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
pSmad2	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:200 in 0,5 %	AP-konjugierte chicken-anti-rabbit

		BSA/TBST	1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
pSmad3	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:200 in 0,5 % BSA/TBST	AP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
Smad7	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:200 in 0,5 % BSA/TBST	HRP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
TGF- β 1	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:200 in 0,5 % BSA/TBST	HRP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
TGF- β 2	5 % BSA/TBST	Anti-rabbit 1:200 in 0,5 % BSA/TBST	HRP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST

Tabelle 3-15: Übersicht der nachgewiesenen Proteine und der spezifischen Antikörper

Zur Entwicklung der Membran über AP wurde diese nach dem letzten Waschschrift für 5 min in Detektionspuffer geschwenkt. Danach wurden 800 μ l Detektionspuffer mit 8 μ l CDP-Star (Roche, Penzberg) vermischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Eingeschlagen in einer Folie wurde die Membran für 5 min bei RT inkubiert.

Für die Detektion über den HRP-gekoppelten Antikörper war kein zusätzlicher Waschschrift nötig. Hier wurde die Membran direkt mit 1 ml Luminata Forte Western HRP Substrat (Millipore Corporation, Billerica, USA) bedeckt, ebenfalls in eine Folie eingeschlagen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Entwicklung des Chemilumineszenz-Signals wurde mit dem LAS 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) digital detektiert. Das relevante Protein erscheint hierbei als schwarze Bande, da das lumineszierende Produkt in Graustufen abgebildet wird.

3.4.3.4 Quantifizierung mittels Ladungskontrolle

Um auf die detektierte Gesamtmenge des zu untersuchenden Proteins schließen zu können, wurden, wie bei der quantitativen Real-Time RT-PCR (siehe Punkt 3.3.5), „Housekeeping“-Gene herangezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Normierung des Proteingehalts mit dem Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und dem Protein α -Tubulin bewerkstelligt. Konkret wurde die Membran für die Ladungskontrolle nach Detektion des unter Punkt 3.4.3 relevanten Gens dreimal 10 min mit TBST gewaschen und anschließend nochmals für 30 min mit 5 % BSA in TBST blockiert. Der primäre spezifische Antikörper gegen GAPDH war bereits mit der Merrettich-Peroxidase gekoppelt. Deshalb konnte hier 1 h nach Inkubation bei RT direkt mit der Entwicklung über das HRP-Substrat fortgefahren werden. Bei der Verwendung von α -Tubulin war ein sekundärer Antikörper nötig. Dieser wurde wiederum nach dreimaligem Waschen für 10 min für 1 h bei RT auf die Membran gegeben. Die Detektion erfolgte je nach Enzym nach der jeweiligen unter Punkt 3.4.3.3 beschriebenen Methoden mit CDP-Star oder dem HRP-Substrat. Für die Analyse und die Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale wurde die Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt) verwendet.

Zusätzlich wurde sich auch der Technik der Coomassie-Färbung (Sambrook *et al.*, 1989) bedient. Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue R 250 kann an die basischen Bereiche der Polypeptidketten binden. Dies führt zu einer unspezifischen Färbung der Gesamtproteine auf der Western Blot Membran und konnte somit auch als Ladungskontrolle verwendet werden.

Die PVDF-Membran wurde für mindestens 10 min bei RT in die Coomassie-Färbelösung gegeben. Darauf folgend wurde die Färbelösung abgegossen und mit Entfärbelösung über Nacht, unter ständigem Schütteln, geschwenkt. Die Membranen wurden anschließend getrocknet und mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) fotografiert.

Protein	Blockierungslösung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
α -Tubulin	5 % BSA/TBS-T	rabbit –anti-alpha-Tubulin 1:2500 in 0,5 % BSA/TBST	HRP- bzw. AP-konjugierte chicken-anti-rabbit 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
GAPDH	5 % BSA/TBS-T	HRP-konjugierte rabbit-anti-GAPDH 1:5000 in 0,5 % BSA/TBST	-

Tabelle 3-16: Übersicht der als Ladungskontrolle verwendeten Antikörper

3.5 Zellkulturtechniken

3.5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Um dies zu gewährleisten, waren alle benötigten Kunststoffmaterialien steril verpackt, genutzte Glaswaren wurden im Vorfeld autoklaviert und alle für die Kultivierung und Versuche gebrauchten Puffer und Lösungen wurden steril filtriert. Ebenfalls wurde das Passagieren und die Behandlung der verwendeten Zelllinien in einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) vorgenommen. Für die *in vitro*-Versuche wurden HTM-N- (Humane Trabekelwerkszellen) und 661-W-Zellen (retinale neuronale Zelllinie, gewonnen aus der Ratte) (Krishnamoorthy *et al.*, 2013) verwendet. Die Kultivierung der humanen Zellen erfolgte bei 37 °C und 7 % CO₂. Die 661-W-Zellen benötigten ebenfalls 37 °C, wurden aber bei einem CO₂-Gehalt von 5 % gehalten. Für die Inkubation aller verwendeten Zelllinien waren spezielle Brutschränke von Hera Cell 150 (Heraeus, Hanau) vorgesehen.

Um das Überleben und das Wachstum der Zellen zu garantieren, wurden für jeden Zelltyp spezifische Zellkulturmedien benötigt und waren grundsätzlich mit fetalem Kälberserum (FBS) und Antibiotika versetzt. Diese sind in der Tabelle 3-17 aufgeführt.

Zelllinie	Medienbestandteile
HTM-N	DMEM mit 10 % FBS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)
661-W	DMEM mit 10 % FBS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)

Tabelle 3-17: Übersicht verwendeter Zellkulturmedien

3.5.1.1 Passagieren der verwendeten Zelllinien und Zellzählung

Beim Passagieren bzw. „splitten“ der Zelllinien wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach Feststellung der Konfluenz, dies bedeutet eines dichten Zellrasens (Monolayer), wurde das in der Zellkulturflasche vorhandene Medium abgezogen. Die Zellen wurden nun mit sterilem PBS (*Phosphate buffered saline*: 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 8,0) gespült, um Reste des im Medium enthaltenen FBSs zu entfernen, damit die Zellen anschließend durch Behandlung mit 0,05 % Trypsin-EDTA von der Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße abgelöst werden konnten. Um die Zellen keinem vollständigen Verdau durch Trypsin auszusetzen, wurde die Reaktion wiederum durch Zugabe von serumhaltigen Medium abgestoppt. Dann wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x g pelletiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis von 1:10 in neue Kulturflaschen ausgesät.

Für Behandlungsversuche wurden 6-Well- bzw. 96-Well-Platten verwendet. Hierbei war es wichtig, eine definierte Anzahl von Zellen pro Well zu haben, damit eine Kontinuität der Versuche gewährleistet war. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte maschinell mit dem Gerät Casy® (Innovatis, Reutlingen) nach Herstellerangaben.

3.5.1.2 Lagerung der Zellen

Für die Aufbewahrung der Zellen bestand die Möglichkeit der Unterbringung im flüssigen Stickstoff. Das Einfrieren und das anschließende Auftauen zu einem variablen Zeitpunkt hatten den Vorteil, die Zellen zu den jeweilig benötigten Zeitpunkten zur Verfügung zu stellen. Beim Einfrieren der Zellen musste auf einen langsamen Temperaturabfall geachtet werden, um die Vitalität der Zellen nicht zu schädigen.

Kurzprotokoll zur Kryokonservierung

- Zellen vom Zellkulturgefäß abtrypsinieren
- Sedimentation der abgelösten Zellen
- Zellpellet in 2 ml DMSO-haltigen Einfriermedium (Tabelle 3-7) aufnehmen
- Zell/Einfriermedium-Gemisch in Kryoröhrchen überführen
- Kryoröhrchen in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß geben
- Langsames Einfrieren der Zellen ü.N. bei -80 °C (ca. -1°C/Minute)
- Überführen in den Stickstofftank zur langfristigen Lagerung

Anders als beim Einfrieren sollten die Zellen beim Auftauen möglichst schnell nach dem Entnehmen aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt werden. Zum Entfernen des Einfriermediums wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium aufgenommen und anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei RT und 300 x g pelletiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension der Zellen in 10 ml frischem Zellkulturmedium. Das gesamte Volumen wurde in ein Zellkulturgefäß gegeben und unter Standardbedingungen kultiviert.

3.5.2 *In vitro*-Experimente

3.5.2.1 HTM-N-Zellbehandlungen

Bei den HTM-N-Zellen handelt es sich um immortalisierte humane Trabekelwerkszellen. Diese Zelllinie wurde verwendet, um Effekte von CTGF im Trabekelwerk *in vitro* abschätzen und molekulare Zusammenhänge aufklären zu können.

3.5.2.2 Induktion

Um zu überprüfen, ob in HTM-N-Zellen ein konstitutiv aktiver BMP-Signalweg präsent ist, wurden 1×10^5 HTM-N-Zellen/Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen adhäriert waren, wurden sie für 24 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und je zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml DMEM ohne Zusätze auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit BMP4 (10 ng/ml) oder BMP7 (10 ng/ml) behandelt, um die Aktivität des BMP-Signalwegs zu induzieren. Die Ernte der Zellen für eine nachfolgende Proteinanalyse mittels 400 µl peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz erfolgte, nach Abnahme des Kulturmediums und zweimaligen Waschens

mit PBS, zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 3, 6, 24 h). Für eine zusätzliche immunhistochemische Analyse wurden in den Wells vor Zugabe der HTM-N-Zellsuspension Coverslips ausgelegt. Diese wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS aus den Wells entfernt und für 5 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 0,1 M Phosphatpuffer (Php) für je 5 min, wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen pSmad1/5/8 gefärbt (siehe Punkt 3.7.4.4).

Zur Prüfung des Effektes von CTGF auf die Expression von TGF- β 1, TGF- β 2 und CTGF selbst, wurden $5,5 \times 10^5$ HTM-N-Zellen/Well ebenfalls in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nachdem die Wells eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten, wurden die Zellen serumfrei gemacht. Nach 24 h wurden die Wells mit 5, 50 und 100 ng/ml CTGF behandelt. Nach weiteren 24 h wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mittels 500 μ l peqGold TriFastTM Trizol-Reagenz zerstört. Anschließend wurden die Zelllysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung für die mRNA- und Proteinanalyse (siehe Punkt 3.3.2 und 3.4.1) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.5.2.3 Inhibition

Zur Klärung der Frage, welche Auswirkungen CTGF auf den BMP-Signalweg hat, wurden Tests mit dem BMP-Inhibitor Noggin (R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Konfluente HTM-N-Zellen wurden hierfür für 24 h im serumfreien Medium gehalten und anschließend wurde dem Mangelmedium der jeweiligen Wells BMP4 (10 ng/ml), BMP4 (10 ng/ml) in Kombination mit 60 ng/ml Noggin oder BMP4 (10 ng/ml) + CTGF (50 ng/ml) hinzugegeben. Als Kontrolle dienten nicht behandelte HTM-N-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Inkubation mittels 500 μ l peqGold TriFastTM Trizol-Reagenz für eine Western-Blot-Analyse aufbereitet (vgl. Punkt 3.4).

Des Weiteren sollte in zusätzlichen *in vitro*-Experimenten analysiert werden, inwieweit der Erk- bzw. der RhoA/ROCK-Signalweg einen Einfluss auf den Effekt von CTGF auf die Expression von TGF- β 1 und TGF- β 2 hat. Für diese Inhibitionsversuche wurde ein konfluenter HTM-N-Zellrasen der Wells einer 6-Well-Platte verwendet. 24 h nach einer serumfreien Phase wurden die Zellen für die Blockierung des Erk-Pathways wie folgt in 2 ml serumfreien Medium behandelt:

Kombinationen	Konzentration		
	DMSO 1h Präinkubation	Mek1/2-Inhibitor 1h Präinkubation	CTGF
Kontrolle + DMSO	2 µl	-	-
Kontrolle + Mek1/2-Inhibitor	-	10 µM	-
CTGF + DMSO	2 µl	-	50 ng/ml
CTGF + Mek1/2-Inhibitor	-	10 µM	50 ng/ml

Tabelle 3-18: Behandlungsschemata der Mek1/2-Inhibitor- und CTGF-behandelten HTM-N-Zellen

Der Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) erfolgte in einer äquivalenten Menge zu dem Mek1/2-Inhibitor (UO126, Bioline, Luckenwalde). Um die Hemmung des Erk-Signalweges vor der CTGF-Behandlung zu gewährleisten, wurden der Mek1/2-Inhibitor und das DMSO 1 h vor CTGF-Behandlung zu den Zellen gegeben.

Für die Blockierung des RhoA/ROCK-Pathways kam Fasudil (HA-1077, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), ein ROCK-Kinase-Hemmer, zum Einsatz. Das Behandlungsschemata war hierbei:

Kombinationen	Konzentration	
	Fasudil 1h Präinkubation	CTGF
Kontrolle	-	-
Kontrolle + Fasudil	1 mM	-
CTGF	-	50 ng/ml
CTGF + Fasudil	1 mM	50 ng/ml

Tabelle 3-19: Behandlungsschemata der Fasudil- und CTGF-behandelten HTM-N-Zellen

Vor CTGF-Behandlung wurde HA-1077 ebenfalls für 1 h präinkubiert. 24 h nach der CTGF-Behandlung wurden die Zellen mit 500 µl peqGold TriFastTM Trizol-Reagenz lysiert und für eine quantitative mRNA- und Proteinanalyse, wie unter Punkt 3.3.2 und 3.4.1 beschrieben, weiterverarbeitet.

3.5.2.4 Differenzierung und Behandlung von 661-W-Zellen

3.5.2.4.1 Differenzierung

Der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin ist ein Alkaloid, das aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* gewonnen wird. Die Fähigkeit von Staurosporin, die Bindung von ATP an Kinasen zu unterbinden, macht es zu einem interessanten Werkzeug in der Forschung. Dieser Proteinkinaseinhibitor kann in hohen Konzentrationen zur Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalweges führen, in geringen Mengen jedoch zu einem Zellzyklusarrest und damit zur Ausdifferenzierung von neuronalen Zellen, wie den 661-W-Zellen, beitragen. Diese wurden aus dem Organismus der Ratte isoliert. Es handelt sich dabei um die einzig immortalisierte Zelllinie aus der Retina, welche Ganglienzell-typische Marker wie NMDA-Rezeptoren oder das Neurofilament H exprimieren und deshalb mit RGZ-Zellen vergleichbar sind. Jedoch grenzen sie sich in Morphologie und in ihrer Teilungsrate von primären retinalen neuronalen Zellen ab. Durch den Einsatz von Staurosporin wird ein Proliferationsstop generiert, was das Auswachsen zahlreicher Dendriten und Axone begünstigt. Dieser so entstandene Zellverbund weist auch eine veränderte, den *in situ*-vorkommenden Zellen ähnliche Morphologie auf. Es kommt zu einer abgerundeten, erhöhten Form des Zellsomas (Frassetto *et al.*, 2006). Die durch Staurosporin induzierten neuronähnlichen Zellen erlauben nun vergleichbare und aussagekräftige *in vitro*-Experimente.

Zur Ausdifferenzierung der 661-W-Zellen wurde von bereits adhären Zellen das serumhaltige Medium abgezogen. Hieran schließen sich zwei Waschschrte mit PBS an. Danach wird das in serumfreien Medium 1:400-verdünnte Staurosporin für 1 h bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert. Abschließend wird das Proteinkinaseinhibitor-enthaltene Medium abgesaugt und die Zellen ü.N. durch Zugabe von Vollmedium regeneriert.

3.5.2.4.2 Behandlungen

Für die Verifizierung eines konstitutiven BMP-Signalweges und zur Abschätzung eines CTGF-Effektes in 661-W-Zellen wurden 1 x 10⁵ Zellen pro Well inklusive Coverslips auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach Ausdifferenzierung und einer 24-stündigen Haltung der Zellen unter serumfreien Bedingungen wurden sie mit BMP7 (10 ng/ml), CTGF (50 ng/ml) und einer Kombination beider für 24 Stunden behandelt. 24 h nach Behandlung wurde das Zellkulturmedium abgenommen, zweimal mit PBS

gewaschen und für 5 min mit 4 % PFA fixiert. Um Reste der Fixans zu entfernen, wurde dreimal für 5 min mit 0,1 M Php gewaschen. Danach konnten die Zellen für eine pSmad1/5/8 Färbung (siehe Punkt 3.7.4.3) verwendet werden.

Um zu diagnostizieren, ob die Expression der neurotrophen Faktoren nach CTGF-Behandlung beeinflusst wird, wurden $5,5 \times 10^5$ 661-W-Zellen per 6-Well ausgesät. Nachdem die 661-W-Zellen 24 h unter Mangelbedingungen kultiviert wurden, konnten die Zellen weitere 24 h mit CTGF (50 ng/ml) behandelt werden. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert. Mittels quantitativer Real-Time RT PCR wurde repräsentativ für neurotrophe Faktoren auf die Expression des Lens Derived Growth Factors (LEDGF), des Pigment Epithelium Derived Factors (PEDF) und des Glial Cell line-derived Neurotrophic Factors (GDNF) hin untersucht.

3.5.2.4.3 MTT-Assay

Der Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide-Assay (Roche, Mannheim) wird verwendet, um die Zellviabilität zu bestimmen. Dieser Test gründet auf der Reduktion des gelblich wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in einen violetten, kristallinen Farbstoff, dem wasserunlöslichen Formazan.

Gesunde, vitale Zellen können diese Reaktion durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysieren, nachdem das Tetrazoliumsalz von den Zellen aufgenommen wurde. Durch die Zugabe von DMSO werden die Zellen lysiert und das entstandene Formazan kann gelöst werden. Anschließend besteht die Möglichkeit einer photometrischen Messung. Hierdurch lässt sich auf den Gehalt des gebildeten Formazans, und somit auch auf die Viabilität der Zellen zurückschließen. Die Extinktion ist dabei umgekehrt proportional zur Vitalität der Zellen.

Dieser Test wurde angewandt, um die Effekte von CTGF und BMP7 unter Mangelbedingungen (siehe Punkt 3.5.2.4.2) auf die Viabilität der 661-W-Zellen abschätzen zu können. Für die Untersuchung wurden 3×10^4 661-W-Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen an den Plattenuntergrund adhärirt waren, wurden sie wie unter Punkt 3.5.2.4.1 beschrieben mit Staurosporin für 1 h ausdifferenziert. Nach einer Regenerationsphase ü.N. wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C unter serumfreien Bedingungen gehalten, um sie anschließend für weitere 24 h zu behandeln. Im Detail wurden folgende Konzentrationen und Kombinationen der rekombinanten Proteine zu den Zellen gegeben:

Kombinationen	Konzentration	
	CTGF	BMP7
CTGF	50 ng /ml	-
BMP7	-	1 mM
CTGF + BMP7	50 ng/ml	1 mM

Tabelle 3 - 20: Übersicht der Kombinationsbehandlungen von CTGF und BMP7 an 661-W-Zellen

Als Referenz wurden unbehandelte Zellen verwendet. Nach der 24-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgezogen und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 80 µl der frisch angesetzten und steril filtrierten MTT-Solution (siehe Tabelle 3-7) überschichtet und für 3 h im Brutschrank kultiviert. Die Bildung des Formazans konnte danach leicht über die lichtmikroskopische Betrachtung der behandelten Zellen bestätigt werden. Der violette, kristalline Farbstoff wurde durch Zugabe von 150 µl MTT-Solvent (siehe Tabelle 3-7) aus den Zellen gelöst. Nachdem die Platte unter Lichtausschluss für 15 min geschwenkt wurde, konnte die Bestimmung der Zellviabilität am Elisa Reader bei einer Absorption von 590 nm und einer Referenz von 620 nm erfolgen.

3.5.2.4.4 NMDA-Schadensmodell

Zusätzlich zu der Analyse der CTGF-Auswirkungen auf 661-W-Zellen unter Mangelbedingungen sollte sich das NMDA-Schadensmodell zunutze gemacht werden. 661-W-Zellen besitzen NMDA-Rezeptoren. Das Glutamat-Analogon N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) kann, wie der Neurotransmitter Glutamat, an die tetrameren NMDA-Rezeptoren binden. Hierdurch wird der ionotrope Rezeptor aktiviert (Slaughter 2010). Die Bindung von NMDA an diesen Rezeptor führt zu einer Hyperaktivierung, und dadurch zu einem erhöhten Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle. Die Bildung toxischer freier Radikale führt zu proteolytischen Prozessen, die letztlich in der Apoptose der Zelle münden (Lipton 2006). Bei diesem durch NMDA-induzierten Niedergang der RGZ-Zellen spricht man von einer exzitotoxischen Schädigung. Die molekularen Vorgänge, welche zu diesem Untergang der Zellen beitragen, sind jedoch nicht abschließend geklärt (Shen *et al.*, 2006).

Da die exzessive Aktivierung von Glutamatrezeptoren bei Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder dem Glaukom eine wichtige Rolle spielt

(Lipton, 2006), ist dieses Schadensmodell eine elegante Methode, um *in situ*-Bedingungen *in vitro* nachzustellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte so der CTGF-Effekt auf die Expression der neurotrophen Faktoren LEDGF, PEDF und GDNF hin untersucht werden. Zusätzlich wurden die Auswirkungen von CTGF/BMP7 auf die Zellviabilität der 661-W-Zellen analysiert. Die Durchführung dieser Versuche entsprach den unter Punkt 3.5.2.4.2 und 3.5.2.4.3 beschriebenen Experimenten. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die 661-W-Zellen für die Untersuchungen der Expressionslevel von LEDGF, PEDF und GDNF mit NMDA (5 mM) alleine und in Kombination mit CTGF (50 ng/ml) behandelt wurden. Als Kontrolle dienten hier wiederum unbehandelte Zellen.

Für die Analyse der Einflüsse von CTGF und BMP7 im Schadensmodell auf die 661-W-Zellviabilität wurden die Zellen 24 h folgenden Kombinations-Behandlungen ausgesetzt:

Kombinationen	Konzentration		
	CTGF	BMP7	NMDA
NMDA	-	-	5 mM
NMDA + CTGF	50 ng/ml	-	5 mM
NMDA + BMP7	-	1 mM	5 mM
NMDA + CTGF + BMP7	50 ng/ml	1 mM	5 mM

Tabelle 3-21: Übersicht der Kombinationsbehandlungen von CTGF und BMP7 an RGZ-Zellen im NMDA-Schadensmodell

Für die Auswertung des MTT-Assays nach exzitotoxischer Schädigung wurden ebenfalls unbehandelte 661-W-Zellen als Referenzwert herangezogen.

3.5.2.5 Behandlung von primären RGZ-Zellen

Zusätzlich zur Untersuchung der Effekte von BMP4, -7 und CTGF auf die Überlebensfähigkeit der 661-W-Zellen, sollten die Auswirkungen auf primäre RGZ-Zellen überprüft werden. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Zhiyong Yang (John-Hopkins Universität, Baltimore, USA) durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe etablierte eine Methode zur Isolierung von primären RGZ-Zellen aus Retinae der Ratte mittels magnetischen Mikrokügelchen. Das Protokoll hierfür ist in der Studie von Kerrison *et al.* aufgeführt (Kerrison *et al.*, 2005). Die für dieses Experiment

verwendeten rekombinanten Proteine, Lösungen, magnetischen Mikrokügelchen, Verbrauchsmaterialien sowie die genutzten Geräte sind ebenfalls der Publikation von Kerrison *et al.* zu entnehmen.

Für die Experimente der Auswirkungen von CTGF, BMP4 und 7 wurden primäre RGZ-Zellen murinen Ursprungs verwendet. Die Isolation der RGZ-Zellen aus der Maus gestaltete sich dabei ebenfalls nach der bei Kerrison *et al.* dargestellten Methode. Anschließend wurden 5000 Zellen/Well einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Nachdem die Zellen adhäriert waren, wurden sie für 24 h mit 20 ng/ml BMP4, 7 ng/ml BMP7 und 50 ng/ml CTGF versetzt. Zusätzlich wurden 10 ng/ml rekombinanten Ciliary Neurotrophic Factors (CNTF) und 50 ng/ml des Brain-Derived Growth Factors (BDNF) als Referenz zur Abschätzung eines neuroprotektiven Signals der BMPs eingesetzt. Um die Auswirkung von CTGF auf die Zellzahl der primären RGZ-Zellen zu untersuchen, erfolgte eine Kombinationsbehandlung aus BMP4 und CTGF. Zusätzlich wurde Dorsomorphin (2 μ M), ein selektiver Inhibitor des BMP-Signalwegs, verwendet. Hierdurch sollte der Grad der Auswirkungen von CTGF bewertet werden.

Für die Auswertung wurden die Wells mittels Cellomics KSR Instrument (Cellomics, Inc., Pittsburgh, PA) gescannt, um anschließend die Zellzahl über die Software *Extended Neurite Outgrowth* (Cellomics, Inc., Pittsburgh, PA) bestimmen zu können (Kerrison *et al.*, 2005).

3.6 *In vivo*-Experimente

3.6.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Versuche wurden zum einen die transgenen β B1-CTGF-Mäuse und zum anderen CD1-Mäuse verwendet. Das Zuchtpaar des Mauseauszuchtstamms CD1 wurde von Charles River in Sulzfeld erworben. Die CTGF-Überexpressionsmäuse im CD-1 Hintergrund wurden in der eigenen Arbeitsgruppe generiert und wurden von PD Dr. Rudolf Fuchshofer zur Verfügung gestellt (Junglas *et al.*, 2012). Die transgenen Tiere tragen ein Konstrukt durch welches die linsenspezifische Expression von CTGF sichergestellt wird:



Abbildung 3-1: **β B1-CTGF-Konstrukt der CTGF-überexprimierenden Mäuse** (bereitgestellt und modifiziert von PD Dr. Rudolf Fuchshofer).

Die cDNA des murinen CTGF steht dabei unter Kontrolle eines chicken- β B1-Crystallin-Promotors. Zusätzlich befindet sich im Konstrukt eine SV40 poly(A)-Sequenz einschließlich des SV40 small T-Introns, wodurch das Polyadenylierungssignal für die Stabilisierung der CTGF-mRNA mittranskribiert wird. Für die Analyse der transgenen Tiere wurden 8 Wochen alte β B1-Mäuse verwendet. Als Kontrolltiere dienten Wildtyp-Geschwistertiere, deren Vorkommen im selben Wurf anhand der Verpaarung eines transgenen Tieres mit einem CD1-Wildtyp (WT)-Tier sichergestellt wurde. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte wie unter Punkt 3.2 beschrieben.

Des Weiteren wurden für die Studien, die den hinteren Augenabschnitt betrafen, CD1-WT-Tiere im Alter von 10–12 Wochen benötigt. Alle Tiere wurden aus der eigenen Zucht von Herrn Prof. Tamm (Institut für humane Anatomie und Embryologie) bereitgestellt.

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Versuche lagen genehmigte Tierversuchsanträge vor. Des Weiteren wurden die Mäuse unter Berücksichtigung des „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ gehalten. Die Standardbedingungen hierfür sind eine Raumtemperatur von 23 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 % und Futter bzw. Wasser *ad libitum* und ein zwölfständiger Hell-Dunkel-Rhythmus.

Alle Tiere befanden sich im Tierstall der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

3.6.2 Präparation der zu analysierenden Gewebe

3.6.2.1 Herzkammer-Perfusion

Die Technik der Perfusionsfixierung wurde für die Gewinnung der Augen herangezogen, die für Kryo- und Paraffingewebeschnitte verwendet wurden. Der Vorteil dabei ist eine schnelle Gewebefixierung der gesamten Organe im Vergleich zu einer Immersionsfixierung. Des Weiteren machte man sich durch diese Technik

zunutze, dass die Erythrozyten aus den Kapillaren gespült wurden. Diese besitzen eine hohe Eigenfluoreszenz und könnten bei einer Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie störend sein.

Die Perfusion wurde wie folgt durchgeführt:

- Anästhesie der Mäuse mit Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/ml Körpergewicht)
- Eröffnung der *Cavitas abdominalis*
- Lösung des Diaphragmas vom Rippenbogen
- Laterale Öffnung des *Thorax* zu beiden Seiten
- Freilegung des Herzens
- Einstich der Ecoflo Kanüle in den *Apex cordis* des linken Ventrikels
- Schnitt in das rechte Atrium
- Perfusion mittels heparanisiertem 0,9 %-igem NaCl (1 ml Heparin-Natrium auf 1 l NaCl 0,9 %)
- Entfernung des Blutes aus dem Kreislauf, bis eine Hellfärbung der Organe erkennbar ist
- Fixierung der Gewebe über Perfusion mit 4 % PFA
- Entnahme der Augen und/oder des Sehnervs

Die entnommenen Augen und/oder Sehnerven der 8 Wochen alten β B1-Mäuse wurden für diverse immunhistochemische Färbungen nach Gewinnung von Gefrierschnitten benötigt, während Paraffin-Semidünnschnitte von Augen der intravitreal injizierten CD1-Tiere für die Markierung von apoptotischen RGZ-Zellen und der Feststellung eines pSmad1/5/8-Signals verwendet wurden (siehe Punkt 3.7.4.1, 3.7.4.2 und 3.6.3.3.1).

3.6.2.2 Entnahme der Augen, Sehnerven und Schwanzspitzen

Die Augen der perfundierten Tiere wurden mittels stumpfer, gebogener Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg) aus den Augenhöhlen entnommen. Die Augen der intravitreal injizierten CD1-Mäuse, die für die Analyse der Axonanzahl der *Nervi optici* benötigt wurden, wurden drei Wochen nach Injektion und Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation, mit einer Pinzette entnommen. Die an den Augen befindlichen Sehnerven wurden dort belassen oder mittels Schere (Fine Science Tools,

Heidelberg) vom Augapfel entfernt, um eine schnellere Analyse der Sehnerven im Längs- oder Querschnitt zu ermöglichen.

Für die Genotypisierung (siehe Punkt 3.2) wurden die CTGF-Überexpressionsmäuse durch Inhalation mit Isofluran narkotisiert. Die Biopsie der Schwanzspitze (ca. 0,5 cm) für die spätere DNA-Analyse erfolgte mit einer Schere.

3.6.2.3 Cornea- und Retinapräparation

Für die mRNA- bzw. Proteinanalyse (siehe Punkt 3.3.2 und 3.4.1) von Retina und Cornea der β B1-CTGF und der intravitreal injizierten Mäuse wurden diese Gewebeteile der enukleierten Augen präpariert (siehe 3.6.2.2). Hierfür wurde das Auge zunächst mit einer Kanüle am Augenäquator perforiert, um danach mit einer Federschere (Fine Science Tools, Heidelberg) zirkulär an der *Ora serrata* den vorderen vom hinteren Augenabschnitt zu trennen. Die so isolierte Cornea wird bis zur weiteren Verwendung in 500 μ l peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz bei -20 °C gelagert. Eine Probe entspricht dabei einer präparierten Cornea.

Aus dem verbliebenen posterioren Anteil des Auges wird die Linse mit einer Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg) vorsichtig entfernt. Anschließend wird mit der Pinzette ausgehend vom Ansatzpunkt des *Nervus opticus* Richtung *Ora serrata* mit leichtem Druck die Retina aus dem Augenbecher gelöst und ebenfalls in 500 μ l peqGold TriFast™ Trizol-Reagenz gegeben. Die Retinae einer CTGF-Überexpressionsmaus wurden dabei gepoolt, während die Retinae der intravitreal injizierten CD1-Tiere in der späteren mRNA- und Proteinanalyse getrennt voneinander betrachtet wurden.

3.6.3 Intravitreale Injektionen

3.6.3.1 Durchführung

Für die intravitrealen Injektionen wurden CD1-Tiere durch eine Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert. Die Augen wurden vor dem Eingriff mit einer 10 %-igen Jodlösung desinfiziert. Für die eigentliche Glaskörperinjektion wurde eine 25 μ l Hamiltonspritze (Roth, Karlsruhe) mit einer 35-Gauge-Kanüle (W.P.I., Berlin) verbunden. Der zu applizierende Stoff wurde mit der Kanüle aufgezogen und über den Einstich am Augenäquator durch die Sklera, vorbei an der Linse, in Richtung *Nervus opticus* in den Glaskörper gespritzt. Nach Injektion von 3 μ l der gewünschten Substanz blieb die Kanüle noch etwa 20 s im Glaskörper. Diese Verzögerung sollte

dem Auge die Möglichkeit geben, die durch die Injektion bedingte Volumenänderung auszugleichen und einen Wiederaustritt der Substanz beim Entfernen der Nadel zu vermeiden.

10–12 Wochen alte CD-1 Tiere wurden in der vorliegenden Arbeit für die Analyse der Auswirkungen von CTGF und BMP7 auf die Axone der *Nervi optici* und auf die Anzahl der apoptotischen RGZ-Zellen im gesunden und im krankhaften Auge verwendet. Eine krankhafte Beeinträchtigung des Auges wurde dabei durch das NMDA-Stressmodell (siehe Punkt 3.5.2.4.4) simuliert. Die Kombinationen und Konzentrationen der applizierten Substanzen sind der Tabelle 3-22 zu entnehmen. Dabei wurden pro Tier 3 µl einer Kombination in ein Auge injiziert, wobei das kontralaterale Auge die jeweilige Kontrollbehandlung erhielt. PBS war dabei die Referenz für das Modell des gesunden und NMDA die Kontrolle des krankhaften Auges.

Kombination	Konzentration			
	PBS	CTGF	BMP7	NMDA
PBS	3 µl	-	-	-
CTGF	-	30 ng/ml	-	-
BMP7	-	-	30 ng/ml	-
CTGF + BMP7	-	30 ng/ml	30 ng/ml	-
NMDA	-	-	-	10 mM
NMDA + CTGF	-	30 ng/ml	-	10 mM
NMDA + BMP7	-	-	30 ng/ml	10 mM
NMDA + CTGF + BMP7	-	30 ng/ml	30 ng/ml	10 mM

Tabelle 3-22: Übersicht über die intravitreal injizierten Kombinationen von CTGF, BMP7 und NMDA

Ebenfalls wurde mittels Glaskörperinjektion der Einfluss von CTGF auf die Expression neurotropher Faktoren analysiert. 3 µl von CTGF (30 ng/ml) und NMDA (10 mM) wurden alleine oder in Kombination in den Glaskörper eingebracht. 6 h nach Applikation wurden die Retinae präpariert (siehe Punkt 3.6.2.3) und mit der Technik der quantitativen Real-Time RT PCR auf den mRNA-Gehalt von Neurotrophin-3 (NTF-3), Lens Derived Growth Factor (LEDGF) und Fibroblast-Growth-Faktor-2 (FGF2) hin untersucht. Als Kontrolle wurden hier PBS injizierte Augen verwendet.

3.6.3.2 Quantifizierung der RGZ-Axonanzahl

Um die Auswirkungen der applizierten Substanzen (vgl. Tabelle 3-22) auf die Gesamtanzahl der Axone in den *Nervi optici* zu bestimmen, wurden die Sehnerven drei Wochen nach Injektion in Epon eingebettet (siehe Punkt 3.7.3). Die Analyse erfolgte an mit Phenylendiamin kontrastierten (vgl. Punkt 3.7.4.4) Querschnitten der *Nervi optici*, die für die Evaluation der Axone in einer 100x Vergrößerung lichtmikroskopisch aufgenommen wurden. Zur Quantifizierung wurden alle Axone eines Sehnervs mit Hilfe des Zählungswerkzeugs des Programms *Adobe Photoshop CS3 Extended* (Adobe, San Jose, USA) händisch ausgezählt. Um eine subjektive Interpretation durch den Experimentator auszuschließen, wurden die Übersichtsaufnahmen durch einen anderen Mitarbeiter codiert. Nach der Bestimmung der Axonanzahl wurde der Code der jeweiligen Behandlung zugeordnet und relativ zur Kontrolle dargestellt.

3.6.3.3 Quantifizierung apoptotischer RGZ-Zellen

Die Entnahme der Augen für die Bestimmung der apoptotischen RGZ-Zellen fand 24 h nach Applikation der gewünschten Substanzen statt. Die zuvor perfusionsfixierten Augen wurden für die Paraffin-Einbettung weiterverarbeitet (vgl. Punkt 3.7.2). Für die Markierung der apoptotischen RGZ-Zellen an sagittalen Semidünnschnitten wurde der „Dead-end TUNEL-Assay“ von Promega (Promega, Mannheim) angewendet.

3.6.3.3.1 TUNEL-Assay

Durch die Anwendung des TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Assays ist es möglich, Zellen, welche sich gerade in Apoptose befinden, sichtbar zu machen. Diese Methode basiert auf folgender Grundlage: Während des programmierten Zelltods kommt es zu charakteristischen Doppelstrangbrüchen in der genomischen DNA. Die Aufspaltung der DNA ist üblicherweise zwischen Nukleosomen lokalisiert und führt zu mono- und oligonukleosomalen Fragmenten. Das im TUNEL-Assay enthaltene Enzym TdT hat die Fähigkeit, an die mit ein bis vier Basen langen Überhänge an den 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente zu binden, und diese durch das Anhängen von dNTPs zu verlängern. Die dNTPs, welche ebenfalls im Kit enthalten sind, sind dabei mit Fluoreszein markiert und können anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Dabei ist jede Fluoreszenz-markierte Zelle als apoptotisch zu betrachten.

24 h nach intravitrealer Injektion der in Tabelle 3-22 aufgeführten Kombinationen wurden Augen in Paraffin eingebettet und sagittale Schnitte von ihnen angefertigt.

Die Durchführung des TUNEL-Assays wurde wie folgt durchgeführt:

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte
- Zweimaliges Waschen mit PBS
- Fixierung in 4 % PFA für 15 min
- Zweimaliges Waschen mit PBS
- Anverdau des Gewebes mit Proteinkinase K (20 µg/ml) für 8 min
- Fixierung in 4 % PFA für 5 min
- Inkubation mit *Equilibration Buffer* für 10 min
- 50 µl *TdT-Reaction Mix* je Schnitt
- Inkubation bei 37 °C für 60 min
- Zweimaliges Waschen mit 2 x SSC für 15 min
- Dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min
- Eindeckeln der Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium + Dapi (1:10)

Die TUNEL-markierten RGZ-Zellen wurden mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. Die Anzahl der apoptotischen Ganglienzellen wurde direkt mit dem Zählwerkzeug der *AxioVision Rel. 4.8* Software von Zeiss bestimmt.

Des Weiteren wurden die Augen der PBS, CTGF und der NMDA bzw. CTGF-NMDA injizierten Mäuse zusätzlich nach Anwendung des TUNEL-Assays immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen pSmad1/5/8 gefärbt (vgl. Punkt 3.6.3.3.1 und 3.7.4.1).

3.7 Histologische Arbeitstechniken

3.7.1 Einbettung und Herstellung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von 12 µm dicken Kryoschnitten wurden die Augen aus vorher perfusionsfixierten Tieren (siehe Punkt 3.6.2.1 und 3.6.2.2) entnommen und anschließend 2 h in PFA-Fixierlösung nachfixiert. PFA führt zu einer Quervernetzung von Proteinen und damit zu einer Konservierung des Gewebes zum gewünschten

Zeitpunkt (Luttmann, 2006). Nach Fixierung des Gewebes wurden die Augen dreimal mit PBS gespült um PFA-Reste aus dem Gewebe zu waschen.

Um eine Schädigung des Gewebes durch den Gefriervorgang zu vermeiden, wurden die Augen jeweils für 4 h bei RT mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Sucrose-Lösung (10 % (w/v) Sucrose in 0,1 M Php; 20 % (w/v) Sucrose in 0,1 M Php und 30 % (w/v) Sucrose in 0,1 M Php) behandelt. Die Einbettung der Augen zur Kryokonservierung erfolgte anschließend in Tissue-Tek[®] direkt im Kryostat. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Augen bei –20 °C gelagert.

3.7.2 Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Technik der Paraffineinbettung wurde für die Analyse der apoptotischen RGZ-Zellen nach intravitrealer Injektion von jeweils 3 µl PBS, CTGF, BMP7, CTGF + BMP7, NMDA, NMDA + CTGF, NMDA + BMP7 und NMDA + BMP7 + CTGF verwendet. Die Applikation von NMDA entsprach einer Konzentration von 10 mM. Für BMP7 und CTGF wurden 30 ng/ml injiziert. Ebenfalls wurden Paraffinschnitte für die Doppelfärbung von pSmad1/5/8 und TUNEL-positiven Zellen nach Glaskörperinjektion, herangezogen.

Die für diese Analyse benötigten Augen wurden 24 h nach intravitrealer Injektion präpariert und für 4 h immersionsfixiert. Anschließend wurden die Augen dreimal 10 min mit 0,1 M Php gespült. Die Einbettung des Gewebes erfolgte im Einbettautomaten, nach Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe (Isopropanol (50, 70, 80, 96 und 100 % jeweils 1-2 h)), Xylol (zweimalig 1 h 100 %), in Paraffin (4 h Paraffin, 6 h Paraffin).

Die eingebetteten Augen wurden anschließend auf Holzblöckchen fixiert. Von den Augen wurden mit Hilfe des Supercut-Mikrotoms Schnitte von etwa 5 µm angefertigt.

3.7.3 Epon-Einbettung und Herstellung von semi-Dünnschnitten

Für die Bestimmung der Axonanzahl der *Nervi optici* nach intravitrealer Injektion (siehe Punkt 3.6.3) mussten die Sehnerven mit EM-Fixans (siehe Tabelle 3-7) für 12 h konserviert und viermal für 2 h mit Cacodylatpuffer gespült werden.

Die Sehnerven wurden in 1 % Osmiumtetroxid nachfixiert, das Osmium wurde mit Cacodylatpuffer ausgewaschen und die Augen in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80 %, 90 %, 100 %) entwässert. Die Einbettung in Epon erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten über Azeton nach Standardmethoden: Ethanol/Azeton 1:1; 100 % Azeton; Epon/Azeton 1:2; Epon/Azeton 2:1; 100 % Epon; Aushärten im

Brutschrank 24 h bei 60 °C und 48 h bei 90 °C. Die Lösung für die Eponeinbettung setzte sich dabei aus einer Mischung von Stammlösung A + B im Verhältnis 1:1 (siehe Tabelle 3-7) und einem Beschleuniger DMP-30 (2 %) zusammen. Danach wurden Semidünnschnitte (1 µm) der *Nervi optici* angefertigt. Vor Analyse der Sehnerven mussten die Querschnitte kontrastiert werden (siehe Punkt 3.7.4.4).

3.7.4 Histochemische Färbungen

Die Darstellung von speziellen Strukturen in Gewebeschnitten oder Zellen erfolgte über die Technik der immunhisto- bzw immunzytochemischen Färbung. Die selektive Markierung der Probe wird durch die Bildung eines indirekten, mehrstufigen Antigen-Antikörper-Komplexes erreicht. Der Primärantikörper bindet an den zu untersuchenden Bestandteil der Zellen, während der Sekundärantikörper gekoppelt mit einem Fluorochrom zur Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Punkt 3.8) dient (Luttmann, 2006).

3.7.4.1 Färbungen von Gefrierschnitten

Für die immunhistochemischen Färbungen musste von den eingebetteten Augen bzw. Sehnerven Semidünnschnitte hergestellt werden. Hierfür wurde ein Microm HM 500 OM Kryostats (Microm International, Walldorf) verwendet. Die Gewebeschnitte wurden daraufhin auf Objektträger aufgenommen, kurz bei RT angetrocknet, und nach folgendem Kurzprotokoll vorgegangen:

- Entfernen des Tissue Teks für 1-5 min in 0,1 M Php
- Umranden der Gewebeschnitte mit einem Fettstift (PapPen)
- Blockierung für 1 h bei RT auf dem Schüttler
- Inkubation von 30 µl Primärantikörperlösung (verdünnt in 1:10 Blockierungslösung in 0,1 M Php oder 1 x TBS) ü.N. bei 4 °C
- Inkubation von Negativkontrollen nur mit 1:10 Blockierungslösung ü.N. bei 4 °C
- Dreimaliges Waschen für 5 min mit dem für die jeweilige Färbung entsprechenden Puffer
- Inkubation von 30 µl der fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörperlösung (verdünnt in 1:10 Blockierungslösung in 0,1 M Php oder 1 x TBS) für 1 h bei RT

- Dreimaliges Waschen für 5 min mit dem für die jeweilige Färbung entsprechenden Puffer
- Eindeckeln der Schnitte mit *Fluorescent Mounting Medium* + Dapi (1:10)

Bis zur Analyse des Gewebes mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop wurden die Schnitte bei 4 °C gelagert. Eine Aufstellung der verwendeten Antikörper und Blockierungslösungen findet sich in Tabelle 3-23.

Protein	Blockierungslösung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
BDNF	0,2 % CWFG-Puffer (vgl. Tabelle 3-7)	Anti-rabbit 1:50 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php	Cy TM 3 goat-anti-rabbit 1:2000 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php
BMP4	0,2 % CWFG-Puffer	Anti-goat 1:50 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php	Cy TM 3 donkey-anti-goat 1:2000 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php, Alexa Fluor [®] 488 donkey-anti-goat 1:1000 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php
BMP7	0,2 % CWFG-Puffer	Anti-goat 1:50 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php	Cy TM 3 donkey-anti-goat 1:2000 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php Alexa Fluor [®] 488 donkey-anti-goat 1:1000 in 0,02 % CWFG/0,1 M PhP
Gremlin	0,2 % CWFG-Puffer	Anti-rabbit 1:50 in 0,02 % CWFG- Puffer/0,1 M Php	ALexa Fluor [®] 488 goat- anti-rabbit 1:1000 in 0,02 %CWFG-Puffer /0,1 M Php
pSmad1/5/8	0,2 % CWFG-Puffer	Anti-rabbit 1:100 in 0,02 % CWFG/1 x TBS	Cy TM 3 goat-anti-rabbit 1:2000 in 0,02 % CWFG/TBS; ALexa Fluor [®] 488 goat-

			anti-rabbit 1:1000 in 0,02 % CWFG/TBS
pSmad2	0,2 % CWFG-Puffer	Anti-rabbit 1:50 in 0,02% CWFG/1 x TBS	Cy TM 3 goat-anti-rabbit 1:2000 in 0,02 % CWFG/TBS
TGF- β 1	0,2 % CWFG-Puffer	Anti-rabbit 1:50 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php	Cy TM 3 goat-anti-rabbit 1:2000 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php
TGF- β 2	0,2 % CWFG-Puffer	Anti-rabbit 1:50 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php	Cy TM 3 goat-anti-rabbit 1:2000 in 0,02 % CWFG/0,1 M Php

Tabelle 3-23: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei immunhistochemischen Färbungen

3.7.4.2 Färbungen von Paraffinschnitten

Um den Einfluss von CTGF auf den BMP-Signalweg zu untersuchen, wurden zuvor TUNEL-markierte Schnitte zusätzlich mit einem Antikörper gegen pSmad1/5/8 gefärbt. Die Durchführung glich dem unter Punkt 3.7.4.1 beschriebenen Kurzprotokoll. Die Beurteilung erfolgte mit dem Zeiss Fluoreszenzmikroskop über einen Cy3-gekoppelten goat-anti-rabbit Sekundärantikörper (1:2000 Verdünnung 1:1000 in TBS).

3.7.4.3 Färbungen von Zellen

Die wie unter Punkt 3.5.2.1 und 3.5.4.2.2 behandelten und bereits für 5 min mit 4 % PFA fixierten HTM-N- und 661-W-Zellen wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen pSmad1/5/8 inkubiert. Die Existenz eines konstitutiv aktiven BMP-Signalwegs im vorderen und hinteren Augenabschnitt sollte hierdurch festgestellt werden.

Die Färbetechnik entsprach dem unter Punkt 3.7.4.1 dargestellten Protokoll, als Sekundärantikörper wurde ein Alexa Fluor[®]488-gekoppelter Sekundärantikörper (1:1000 verdünnt in TBS) verwendet. Die eingedeckelten und pSmad1/5/8-gefärbten Zellen wurden ebenfalls mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.7.4.4 Kontrastierung der *Nervi optici*

Für die Bewertung der Auswirkungen von CTGF und BMP7 unter normalen und krankhaften Bedingungen (vgl. Punkt 3.6.3) auf die Gesamtaxonanzahl der

Sehnerven wurden *Nervi optici* mit Paraphenylendiamin nach folgendem Protokoll kontrastiert:

- Lösen von 500 mg Paraphenylendiamin in 50 ml Ethanol (absolut)
- Drei Tage bei Tageslicht inkubieren
- Präparate 2-3 min mit dieser Lösung färben
- Spülen der Schnitte mit Ethanol

Die kontrastierten *Nervi optici* wurden mit Hilfe des Zeiss Fluoreszenzmikroskops im Hellfeld aufgenommen und anschließend mit der Software *Adobe Photoshop CS3 Extended* ausgezählt.

3.8 Mikroskopie

Die Differenzierung der RGZ-Zellen wurde durch eine lichtmikroskopische Diagnose mit Hilfe des inversen Phasenkontrastmikroskops Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen) verifiziert.

Die Fluoreszenzmikroskopie, eine besondere Form der Lichtmikroskopie, basiert auf der Möglichkeit mit einer bestimmten Wellenlänge einen Fluoreszenzfarbstoff anzuregen. Die Fluorochrome nehmen diese Lichtenergie auf und geben es als Licht anderer Wellenlänge wieder ab, welches durch spezielle Filter im Mikroskop beobachtet werden kann.

Für die Analyse der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte und Zellen sowie die Aufnahme der *Nervi optici* wurde deshalb ein „Axio Imager Z1“-Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) verwendet.

Es wurde pro Tier und Auge ein Objektträger mit jeweils drei Sagitalschnitten der behandelten Augen analysiert, dabei diente ein Schnitt als negativ-Kontrolle, bei dem anstatt der Primärantikörper nur mit 1:10-Blockierungslösung inkubiert wurde.

3.9 Auswertung und Statistik

Die Evaluation der einzelnen Untersuchungen erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Excel 2007 (Microsoft® Corporation, Redmond, USA). Für die Feststellung der Signifikanz von zwei unabhängigen Stichproben wurde der zweiseitige t-Test angewendet. Die Ergebnisse wurden bei $p („Probability“) \leq 0,05$ (*) als signifikant und bei $p \leq 0,01$ (**) als höchstsignifikant

betrachtet. Die Säulen-Diagramme wurden zuerst mit Programm Microsoft® Excel 2007 erstellt und anschließend mit CorelDraw® X4 (Corel® Corporation, Ottawa, CAN) in Vektorgrafiken übertragen. Als Standardfehler wurde in den Diagrammen der Mittelwert mit ihrem Standardfehler (SEM) angegeben.

Für die immunhistochemischen Analysen wurden mindestens drei Wildtyp- mit drei transgenen Tieren verglichen. Auch die Zellfärbungen wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt.

4 Ergebnisse

In unserer Arbeitsgruppe konnte weltweit das erste Glaukom-Modell für das primäre Offenwinkelglaukom generiert werden (Junglas *et al.*, 2012). Hier führte die Linsenspezifische Überexpression von CTGF zu einem erhöhten Augeninnendruck (IOD), der mit einem sukzessiven Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGZ-Zellen) assoziiert war. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen, die zu diesen Veränderungen beitragen können, an diesem Glaukom-Modell weiter untersucht werden. Besonders die Auswirkungen auf das Gleichgewicht von Wachstumsfaktoren sollte dabei eruiert werden, da vermutet wird, dass es beim POWG zu einer Störung der homöostatischen Balance von Wachstumsfaktoren kommt. Die interessantesten Kandidaten hierfür sind innerhalb der TGF- β Superfamilie zu finden, wie beispielsweise TGF- β 2 und BMP4 bzw. -7.

4.1 Analyse der Effekte von CTGF im vorderen Augenabschnitt

Die *in vivo*-Untersuchungen am vorderen Augenabschnitt wurden ausschließlich an β B1-CTGF-Mäusen im Alter von 8 Wochen durchgeführt. Als Kontrolle dienten dabei die wildtypischen Geschwistertiere. Grund hierfür war, dass diese Tiere zu diesem Zeitpunkt einen signifikant erhöhten IOD und einen signifikanten Verlust von Axonen des *Nervus opticus* aufwiesen.

4.1.1 Auswirkungen auf den BMP-Signalweg und die BMP-Expression

4.1.1.1 Inhibition des BMP-Signalwegs durch CTGF

Der Einfluss von CTGF auf die BMPs im TW wurde an immortalisierten humanen TW-Zellen (HTM-N-Zellen) *in vitro* untersucht. Hierfür wurden für 24 h mit 10 ng/ml BMP4 und -7 behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 3, 6 und 24 h) analysiert. Die Aktivierung des BMP-Signalwegs wurde anhand der Phosphorylierung des Smad1/5/8 Proteins geprüft. Die immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen pSmad1/5/8 zeigte in den Kontrollzellen ein konstitutives Signal für das aktive Signalmolekül des BMP-Signalwegs (Abbildung 4-1A und B links), welches durch die Behandlung mit BMP4

und -7 schon nach 1 h Inkubation drastisch erhöht war (Abbildung 4-1A und B rechts).

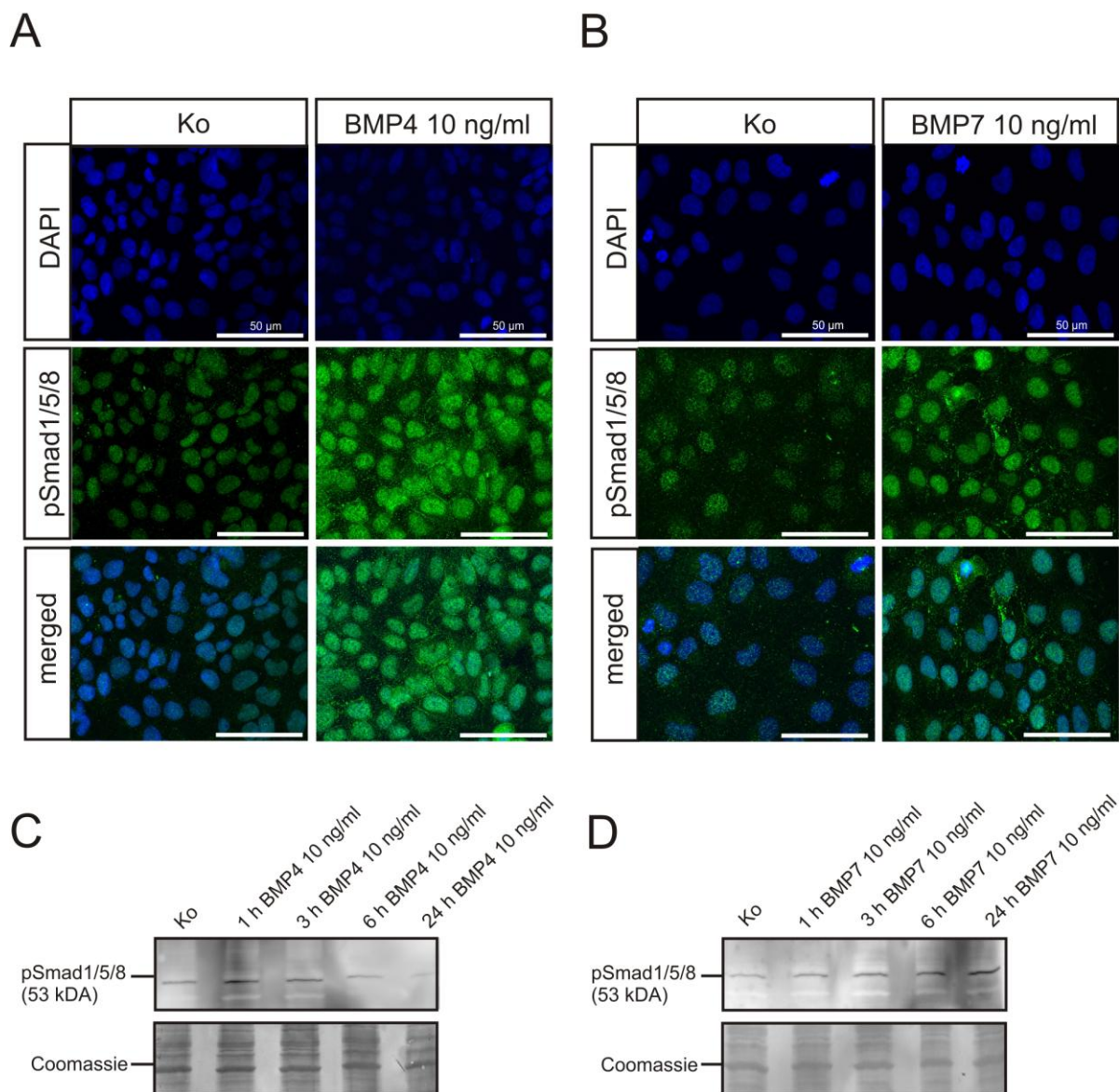


Abbildung 4-1: **Bestätigung eines konstitutiv aktiven BMP-Signalwegs in HTM-N-Zellen mittels pSmad1/5/8.** (A) und (B) Immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen pSmad1/5/8 an unbehandelten und behandelten (BMP4 und 7 (10 ng/ml)) HTM-N-Zellen. Es bestätigte sich ein generelles Vorkommen eines aktiven BMP-Signalwegs in diesen Zellen, der durch eine einstündige Behandlung mit BMP4 bzw. BMP7 nochmals gesteigert werden konnte. Blau: DAPI, Grün: pSmad1/5/8. (C) Western Blot Analyse der Zellextrakte nach Zugabe von BMP4 (10 ng/ml) 1, 3, 6 und 24 h nach Zellernte. Zur Ladungskontrolle wurde die PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Durch die anschließende Proteinanalyse mit einem Antikörper gegen pSmad1/5/8 wurde das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung abgesichert. In Abbildung 4-1C ist die Aktivierung des BMP-Signals 1 h nach Behandlung mit BMP4 am

effektivsten und ging nach 6 h in den Kontrollbereich zurück (BMP4: Ko: $1,0 \pm 0,2$; 1h: $3,2 \pm 0,4$; 3h: $2,2 \pm 0,3$; 6h: $1,4 \pm 0,4$; 24h: $0,9 \pm 0,3$), während die Induktion des Signalwegs in HTM-N-Zellen durch BMP7 nach 24 h am stärksten war (BMP7: Ko: $1,0 \pm 0,3$; 1h: $1,3 \pm 0,4$; 3h: $1,4 \pm 0,1$; 6h: $2,1 \pm 0,3$; 24h: $3,5 \pm 0,5$) (Abbildung 4-1D).

Anhand der *in vivo* Untersuchungen an den vorderen Augenabschnitten (VAA) von 8 Wochen alten β B1- (TG) und deren wildtypischen Geschwistertieren (WT) konnte ein konstitutives pSmad1/5/8-Signal im Bereich der Iris, dem Ziliarkörper und dem Trabekelwerk (TW) detektiert werden (Abbildung 4-2A).

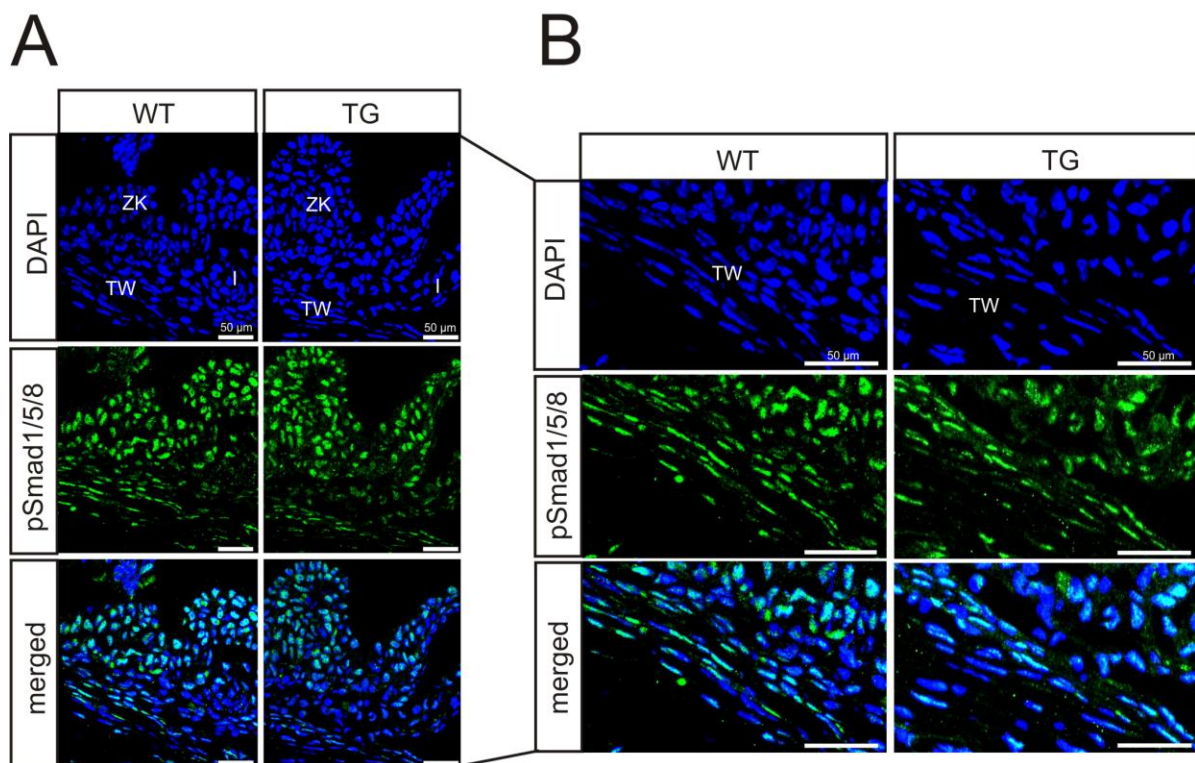


Abbildung 4-2: Verifizierung eines konstitutiv aktiven BMP-Signalweg *in vivo* mittels immunhistochemischer Färbung gegen pSmad1/5/8. (A) Sowohl bei den WT- als auch bei den TG-Tieren zeigte sich eine positive pSmad1/5/8 Färbung im Bereich der Iris (I), dem Ziliarkörper (ZK) und dem TW. (B) In der Vergrößerung des TWs ist eine dramatische Reduktion des für einen aktiven BMP-Signalwegs repräsentativen Signalmoleküls in den 8 Wochen alten TG-Mäusen im Vergleich zu den WT zu verzeichnen. TW: Trabekelwerk, ZK: Ziliarkörper, I: Iris, Blau: DAPI, Grün: pSmad1/5/8, Maßstabsbalken: 50 µm.

Während in der Übersichtsaufnahme kein wesentlicher Unterschied in der Intensität der pSmad1/5/8 Färbung zwischen den TG- und den WT-Mäusen festgestellt werden konnte (Abbildung 4-2A), zeigte sich bei einer höheren Vergrößerung im TW eine signifikante Reduktion der Aktivität des BMP-Signalwegs (Abbildung 4-2B). Dies konnte ebenfalls durch Western Blot Analysen der jeweiligen VAA der Tiere

unterstützt werden (Abbildung 4-3). Hier zeigte sich in den TG-Mäusen eine Hemmung der Phosphorylierung des Signalmoleküls um das $0,50 \pm 0,19$ -fache.

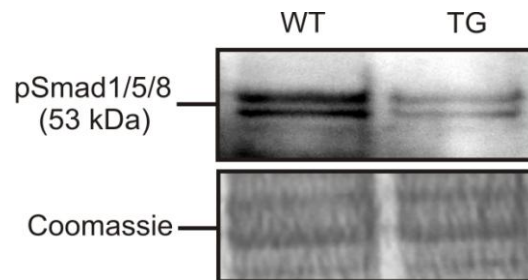


Abbildung 4-3: In VAA der TG-Tiere konnte eine stark abgeschwächte Aktivität des BMP-Signalwegs im Vergleich zu den WT-Tieren detektiert werden. Die Proteinextrakte der VAA von 2 Monate alten TG- und WT-Tieren wurden auf den Gehalt von pSmad1/5/8 hin untersucht. Die Detektion ließ eine $0,5 \pm 0,19$ -fache Inhibition des BMP-Signalweges in den TG-Mäusen erkennen. Zur Ladungskontrolle wurde die PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass CTGF einen inhibitorischen Effekt auf den BMP-Signalweg hat. Um die Potenz der Hemmung zu ermitteln, wurde ein vergleichendes Experiment an HTM-N-Zellen mit CTGF und Noggin, ein spezifischer BMP-Inhibitor, durchgeführt. Die Zellen wurden nach einer serumfreien Phase für 24 h mit BMP4 (10 ng/ml) alleine, in Kombination mit dem spezifischen BMP-Inhibitor Noggin (60 ng/ml) oder mit 50 ng/ml CTGF behandelt. In der anschließenden Western Blot Analyse gegen pSmad 1/5/8 wurde festgestellt, dass CTGF und Noggin den BMP-Signalweg in HTM-N-Zellen gleichwertig blockieren konnten (Abbildung 4-4).

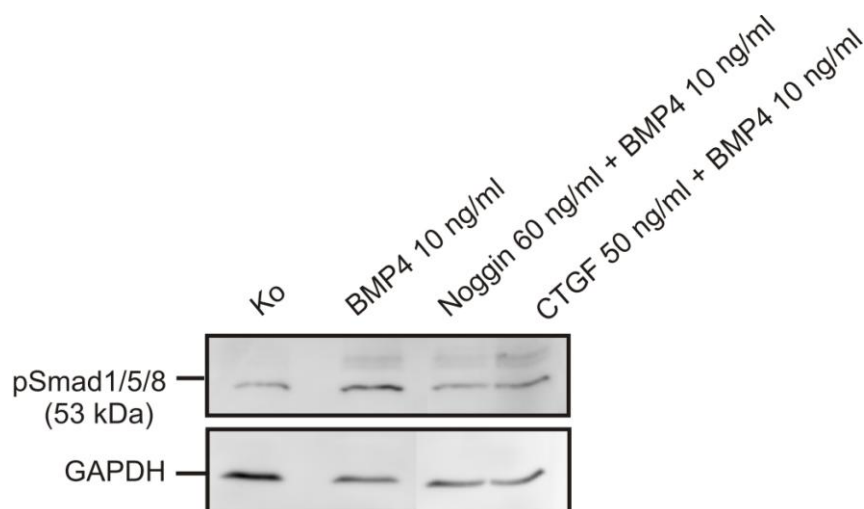


Abbildung 4-4: CTGF inhibierte den BMP-Signalweg so effizient wie Noggin. Detektion des Proteinlysats von behandelten HTM-N Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit 10 ng/ml BMP4, 10 ng/ml BMP4 in Kombination mit 60 ng/ml Noggin oder zusammen mit 50 ng/ml CTGF inkubiert. Die Banden für pSmad1/5/8 bewiesen, dass

CTGF bei der Hemmung des BMP-Signalwegs ebenso effektiv ist, wie der spezifische BMP-Inhibitor Noggin. Als Referenz zum Abgleich diente hier ein Antikörper gegen GAPDH. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

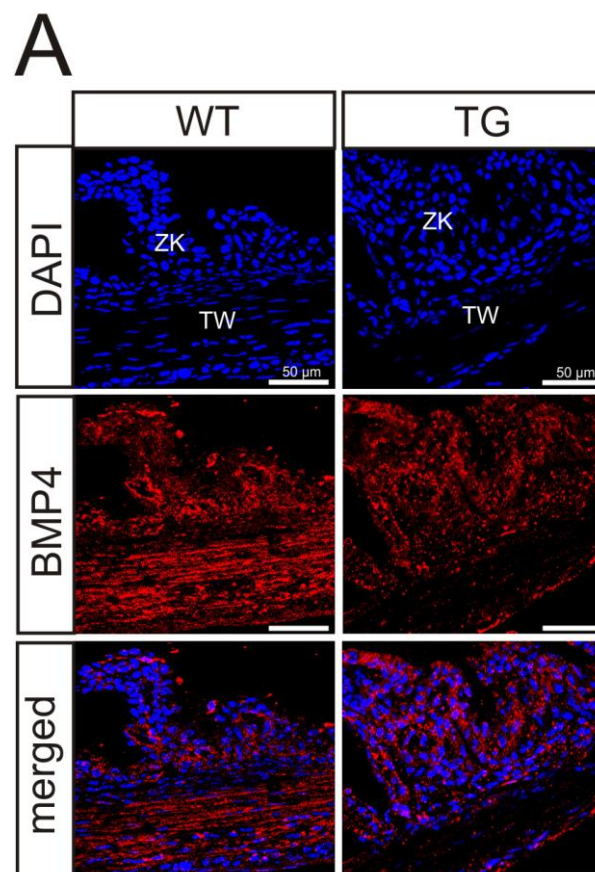
Die densitometrische Auswertung ergab eine $1,2 \pm 0,4$ -fache Blockierung des BMP-Signalwegs durch Noggin im Vergleich zu den unbehandelten HTM-N-Zellen, während die Inkubation von BMP4 (10 ng/ml) zu einer $2,3 \pm 0,2$ -fachen Induktion der Signalmolekülphosphorylierung führte. Der Einfluss von CTGF brachte eine $1,3 \pm 0,3$ -fache Hemmung hervor.

Diese Resultate zeigen, dass CTGF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer effektiven Inhibition des BMP-Signalwegs im anterioren Bereich des Auges führt.

4.1.1.2 CTGF reduziert die Expression von BMP4 und -7

Eine verringerte Signaltransduktion kann entweder das Resultat einer direkten Bindung der BMPs, wodurch z.B. die Wirkungsweise von Noggin erklärt werden kann (Krause 2011), oder durch eine Reduktion der Expression und/oder Synthese der BMPs erreicht werden.

Um den Einfluss der CTGF-Überexpression auf die BMP4 und -7 Synthese und Lokalisation im VAA zu analysieren, wurden immunhistologische Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen BMP4 und -7 angefertigt (Abbildung 4-5).



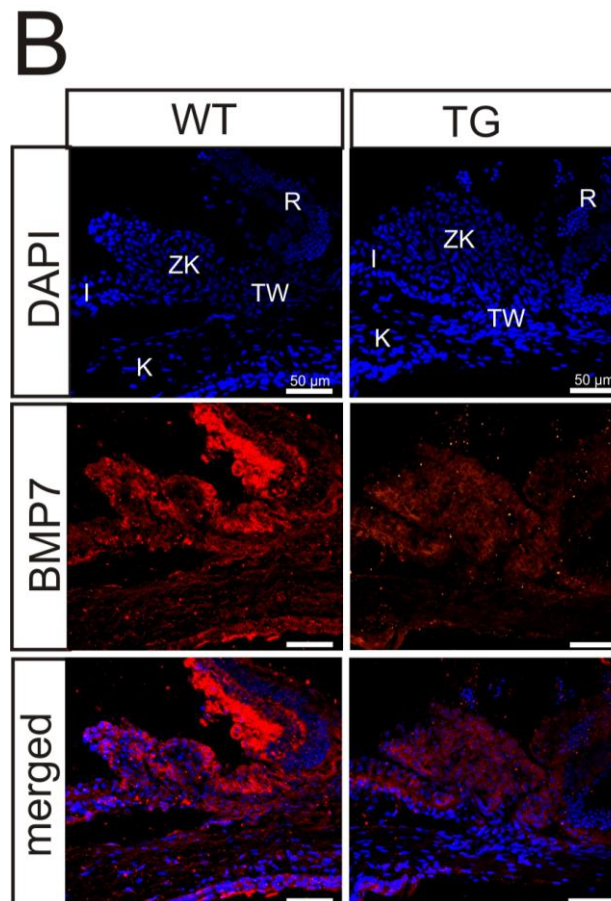


Abbildung 4-5: **Expressionsmuster von BMP4 und 7 im VAA von TG-Tieren (8 Wochen) war unterschiedlich und signifikant reduziert.** (A) In der immunhistochemische Färbung gegen BMP4 ließ sich die stärkste Expression im Bereich des TWs registrieren. In dieser Region kam es, im Vergleich zu den WT-Mäusen in den TG-Tieren zu einer dramatischen Reduktion des Signals für BMP4. (B) BMP7 war im Unterschied zu BMP4 vor allem im Ziliarkörper exprimiert. Auch hier wurde in den TG-Tieren eine Verringerung des Wachstumsfaktors beobachtet. TW: Trabekelwerk, ZK: Ziliarkörper, I: Iris, K: Kornea, R: Retina, Blau: DAPI, Rot: BMP4 bzw. BMP7, Maßstabsbalken: 50 µm.

Es zeigte sich, dass das Vorkommen der beiden BMPs in den WT unterschiedlich ist. BMP4 war sehr dominant im TW vorhanden, während das Signal für BMP7 vor allem im Bereich des Ziliarkörpers beobachtet werden konnte (Abbildung 4-5A und B links). Bei beiden BMP-Isoformen wurde eine deutliche reduzierte Färbung in den TG-Tieren festgestellt (Abbildung 4-5A und B rechts). Für BMP4 konnte nach CTGF Überexpression im Vergleich zum WT nur noch ein schwaches Signal im TW und im Ziliarkörper registriert werden. Auch die Intensität von BMP7 im Ziliarkörper war im TG-Tier herabgesetzt.

Die semiquantitative Analyse dieser Reduktion zeigte, dass die Expression der mRNA, wie auch bei der Translation beider BMPs, unter CTGF-Exposition signifikant reduziert war (Abbildung 4-6).

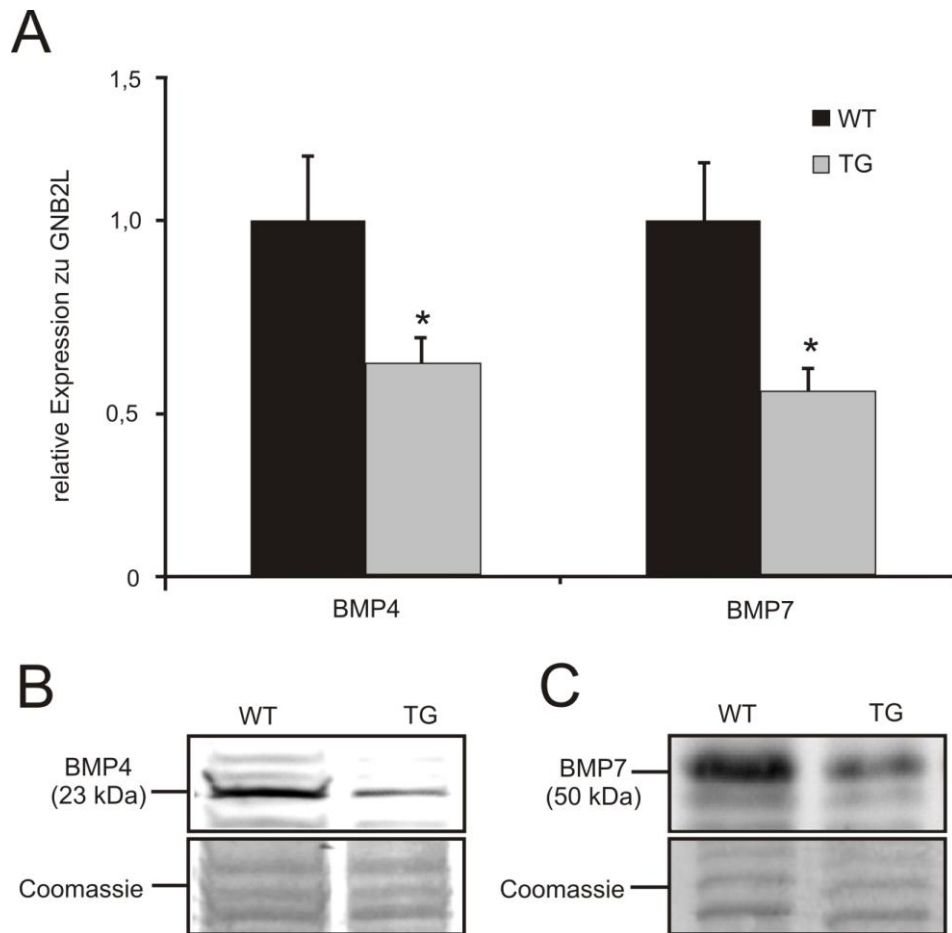


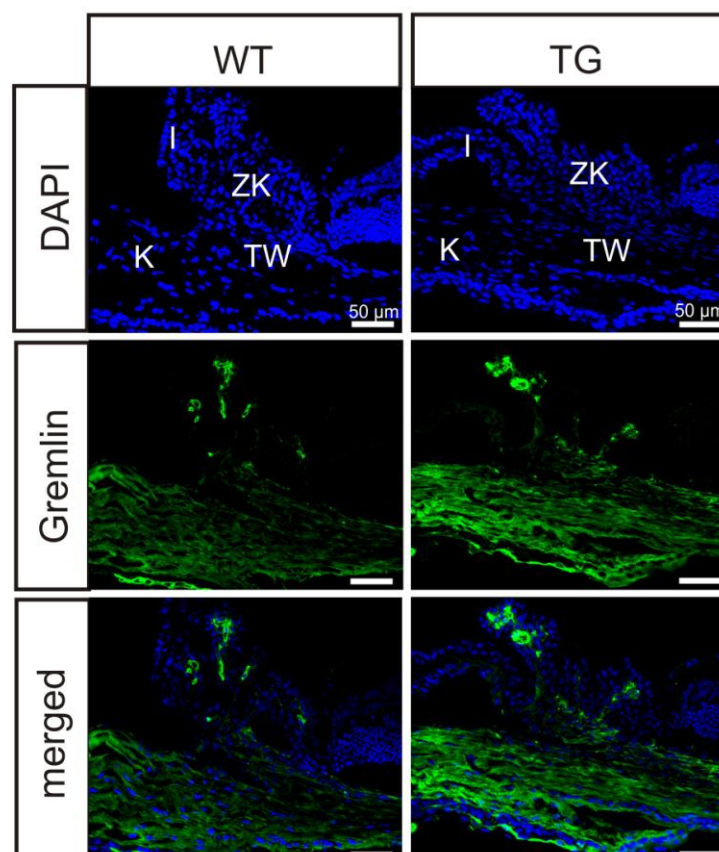
Abbildung 4-6: Die CTGF-Überexpression von 2 Monate alten Tieren führte zu einem mRNA- und Proteinexpressionsabfall von BMP4 und -7. (A) Der Gehalt der untersuchten BMP4- und -7-mRNA, mittels quantitativer Real Time RT-PCR, ist in beiden Fällen durch die CTGF-Überexpression signifikant herunterreguliert (BMP4: $0,65 \pm 0,09$, $p = 0,05$, $n = 8$; BMP7: $0,57 \pm 0,08$, $p = 0,04$, $n = 6$). Als Referenzgen zur Normierung der mRNA diente GNB2L. (B) und (C) Die Western Blot Analysen der TG- und WT-VAA unterstützte die Beobachtungen für die BMP4- und -7-mRNA hochsignifikant bzw. signifikant (BMP4: $0,67 \pm 0,12$, $p = 0,01$, $n = 4$; BMP7: $0,75 \pm 0,08$, $p = 0,03$, $n = 3$). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Die quantitative Real-Time RT-PCR brachte eine signifikante Verringerung der mRNA von BMP4 um $35 \% \pm 0,09$ ($p = 0,05$; $n = 8$) und von BMP7 um fast $50 \% \pm 0,08$ ($p = 0,04$; $n = 6$) hervor. Die Densitometrie der Proteinanalyse ergab eine hochsignifikante Abnahme für BMP4 um 33% ($0,67 \pm 0,12$, $p = 0,01$, $n = 4$) und für BMP7 signifikant um 25% ($0,75 \pm 0,08$, $p = 0,03$, $n = 3$).

4.1.1.3 Gremlin, ein BMP-Antagonist, wird durch CTGF induziert

Wie Noggin stellt auch Gremlin einen spezifischen BMP-Inhibitor dar. Aus Organperfusionsversuchen ist bekannt, dass dieses Molekül ebenfalls wie CTGF zu einem erhöhten IOD und damit zu glaukomatösen Veränderungen beitragen kann (Wordinger *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob CTGF im VAA auch Auswirkungen auf diesen wichtigen Faktor hat. Bei der immunhistologischen Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen Gremlin von 8 Wochen alten Mäusen wurde beim TG-Tier ein deutlich stärkeres Signal für den BMP-Inhibitor im Bereich des Ziliarkörpers und des TWs festgestellt als im WT (Abbildung 4-7A). Auch die mRNA-Analyse zeigte einen signifikanter Anstieg um das $2,8 \pm 0,51$ -fache ($p = 0,04$, $n = 4$) (Abbildung 4-7B).

A



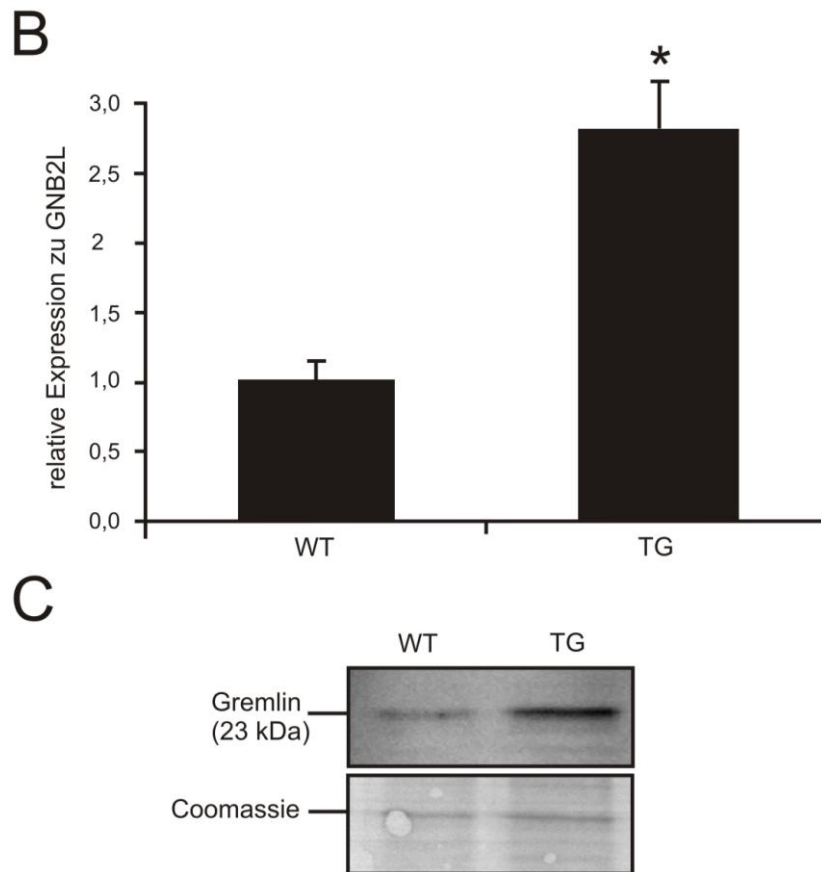


Abbildung 4-7: Die Gremlin Expression war in 8 Wochen alten TG-Mäusen signifikant erhöht. (A) Immunhistochemische Färbung gegen Gremlin. Bei den TG-Tieren konnte im Vergleich mit den WT ein erhöhtes Signal im Bereich des TWs und des Ziliarkörpers notiert werden. Blau: DAPI, Grün: Gremlin, ZK: Ziliarkörper, TW: Trabekelwerk, K: Kornea, I: Iris, Maßstabsbalken: 50 μ m. (B) Die Quantifizierung der mRNA resultierte in einem $2,8 \pm 0,51$ -fachen signifikanten Anstieg der Gremlin Expression ($p = 0,04$, $n = 4$). Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. (C) Die Analyse der Proteinextrakte von VAA verifizierte eine hochsignifikant erhöhte Menge an Gremlin im TG gegenüber dem WT um das $1,9 \pm 0,32$ -fache ($p = 0,008$, $n = 6$). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse von VAA ergab einen signifikanten Anstieg um das $1,9 \pm 0,32$ -fache ($p = 0,008$, $n=6$) (Abbildung 4-7C).

4.1.2 Auswirkungen von CTGF auf den TGF- β -Signalweg und auf die TGF- β 1 und -2 Expression

4.1.2.1 Steigerung der Expression von TGF- β 1 und -2

CTGF ist ein downstream-Mediator von TGF- β (Grotendorst *et al.*, 1997). Jedoch gibt es wenig Hinweise darauf, ob CTGF auch auf den TGF- β -Signalweg und dessen Signalmoleküle Auswirkungen haben kann. Um diesen Punkt zu klären,

wurden die VAA von WT- und TG-Tieren auf den mRNA- und Proteingehalt von TGF- β 1 und -2 hin überprüft (Abbildung 4-8).

Bei der quantitativen Real-Time RT-PCR konnte ein signifikanter Anstieg der Transkription beider Isoformen von TGF- β in den TG-Mäusen registriert werden. Die Expression der TGF- β -1-mRNA war in den 2 Monate alten TG-Tieren im Vergleich zu den WT-Geschwistertieren signifikant um etwa das Zweifache ($2,19 \pm 0,57$, $p = 0,04$, $n = 6$) erhöht. Auch für TGF- β 2 ließ sich eine durch CTGF vermittelte signifikante Steigerung ($1,71 \pm 0,34$, $p = 0,04$, $n = 19$) feststellen.

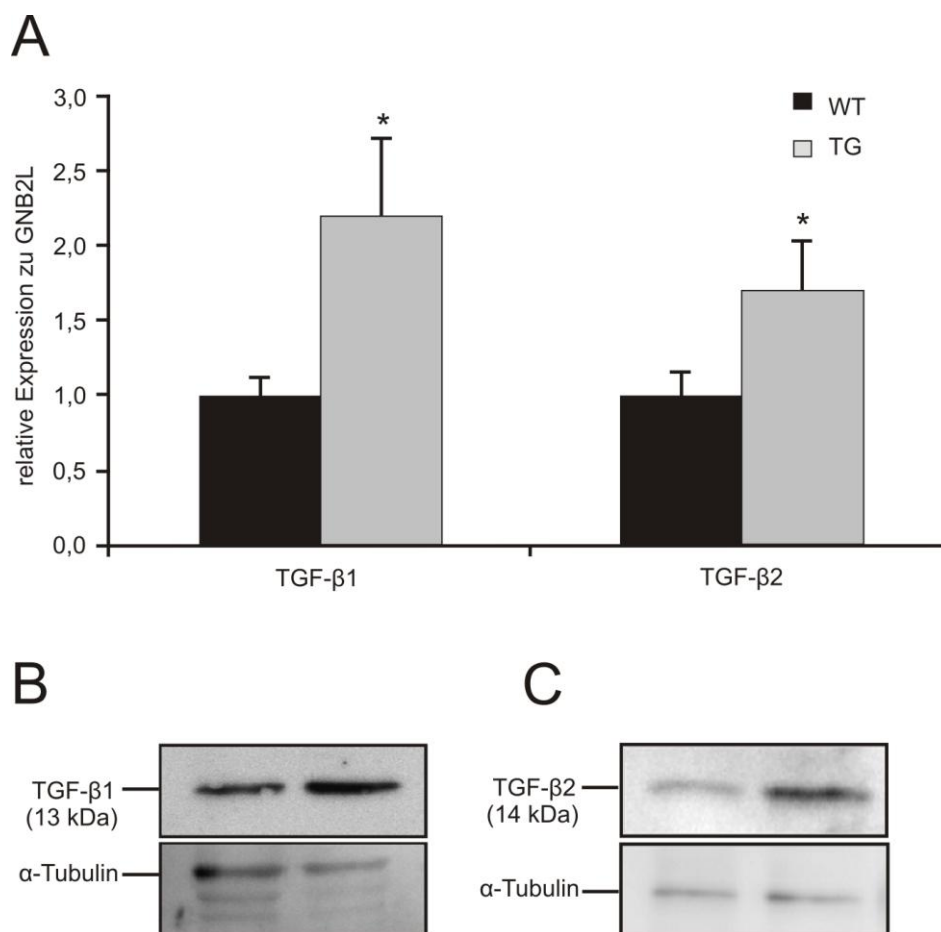


Abbildung 4-8: **Induktion von TGF- β 1 und - β 2 in 2 Monate alten TG-Tieren.** (A) Der mRNA Gehalt von TGF- β 1 und -2 war in 8 Wochen alten TG-Tiere im Vergleich zu den WT signifikant induziert (TGF- β 1: $2,19 \pm 0,57$, $p = 0,04$, $n = 6$; TGF- β 2: $1,71 \pm 0,34$, $p = 0,04$, $n = 19$). Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. (B) und (C) In der Western Blot Analyse für TGF- β 1 und -2 konnte ebenfalls in den TG-Tieren eine vermehrte Proteinmenge verzeichnet werden (TGF- β 1: $1,97 \pm 0,94$; TGF- β 2: $1,96 \pm 0,29$, $p = 0,007$, $n = 6$). Mittelwert \pm SEM *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Die Western Blot Analysen der VAA ergaben ebenfalls eindeutig stärkere Proteinbanden in den TG-Mäusen. Die Menge der beiden TGF- β -Isoformen war

dabei in den TG-Tieren verglichen mit den WT um etwa das Doppelte vermehrt (TGF- β 1: $1,97 \pm 0,94$; TGF- β 2: $1,96 \pm 0,29$, $p = 0,007$, $n = 6$). Allerdings konnte hier nur das Ergebnis für TGF- β 2 als hochsignifikant deklariert werden (Abbildung 4-8).

Die immunhistochemische Färbung gegen TGF- β 2 verifiziert die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche (Abbildung 4-9).

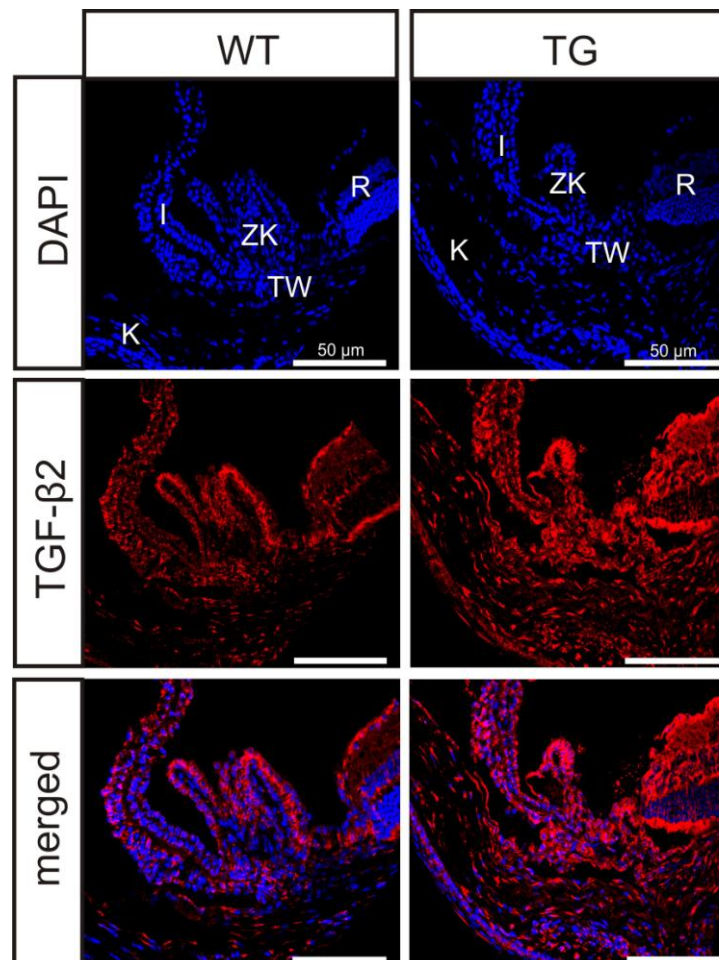


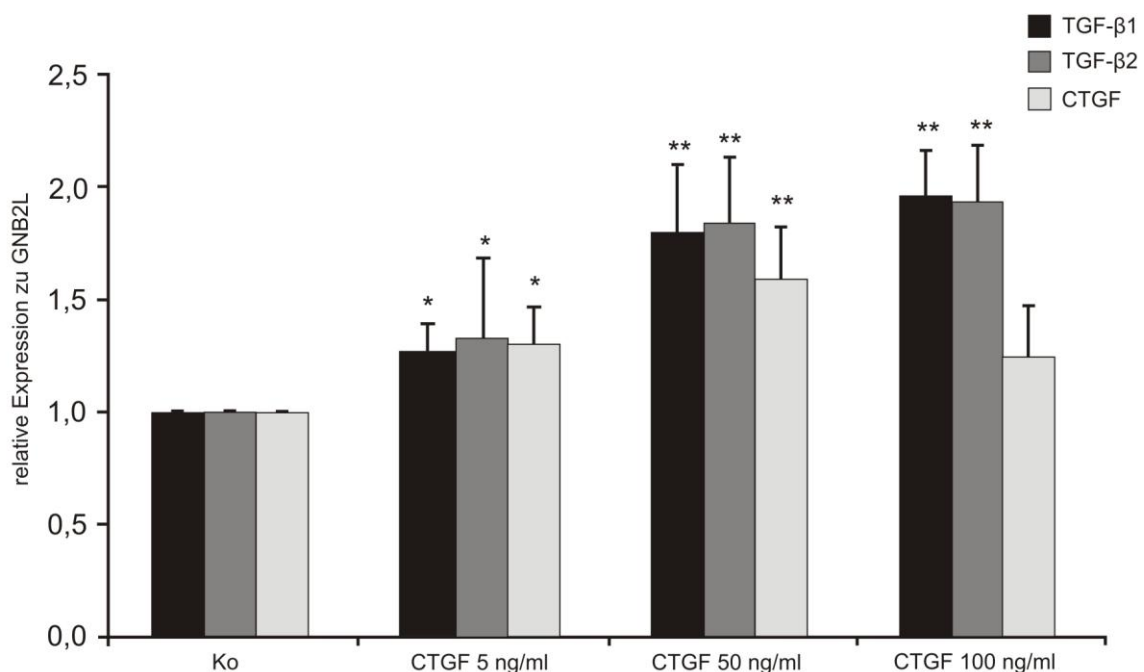
Abbildung 4-9: Die immunhistochemische Färbung gegen TGF- β 2 verifiziert eine Erhöhung in den anterioren Bereichen der TG-Mäuse. Der gesteigerte Gehalt von TGF- β 2 konnte in der immunhistochemischen Färbung bestätigt werden. Das Signal war im Vergleich zu den WT in allen anterioren Bereichen des transgenen Mauseuges signifikant erhöht. Blau: DAPI, Rot: TGF- β 2, ZK: Ziliarkörper, TW: Trabekelwerk, K: Kornea, I: Iris, R: Retina, Maßstabsbalken: 50 μ m.

Die TG-Tiere wiesen im Vergleich zu den WT ein durch CTGF gesteigertes Signal auf. Die Intensität war in allen Arealen des anterioren Augenabschnittes, also der Kornea, der Iris, dem Ziliarkörper und dem für uns am interessantesten Gewebe dem TW, erhöht.

4.1.2.2 CTGF steigert die Synthese von TGF- β 1, -2 und hat einen autoinduktiven Effekt

Um einen sekundären Effekt von CTGF auf TGF- β auszuschließen, wurden Zellversuche durchgeführt. Die HTM-N-Zellen wurden für 24 h unter serumfreien Bedingungen mit unterschiedlichen CTGF Konzentrationen (5, 25, 50 und 100 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe der quantitativen Real-Time RT-PCR und der Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 4-10).

A



B

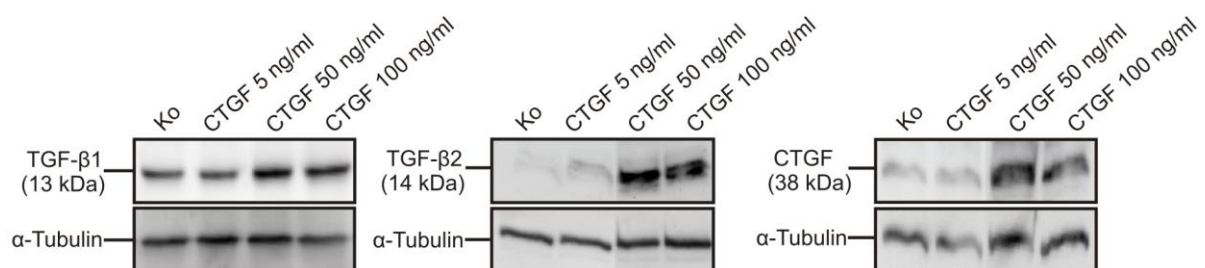


Abbildung 4-10: **Induktion von TGF- β 1, TGF- β 2 und CTGF nach Behandlung von HTM-N-Zellen mit unterschiedlichen CTGF-Konzentrationen (5, 50 und 100 ng/ml).** (A) Die Expression der TGF- β 1- und -2-mRNA wurde durch die CTGF-Behandlung konzentrationsabhängig induziert. Die Werte für 50 und 100 ng/ml CTGF waren hochsignifikant (TGF- β 1: 50 ng/ml CTGF: $1,80 \pm 0,32$; $p = 0,01$, $n = 6$; 100 ng/ml CTGF: $1,97 \pm 0,20$, $p = 1,2 \times 10^{-05}$, $n = 3$; TGF- β 2: 50 ng/ml CTGF: $1,84 \pm 0,30$, $p = 0,004$, $n = 5$; 100 ng/ml CTGF: $1,93 \pm 0,27$, $p = 0,0008$, $n = 5$). (C) Die Transkription von CTGF war nach der Behandlung mit 50 ng/ml CTGF ebenfalls im

Vergleich zu den Kontrollzellen hochsignifikant gesteigert ($1,59 \pm 0,24$, $p = 0,00$, $n = 5$). Jedoch zeigte sich bei 100 ng/ml ein dosiskompensierender Effekt, wodurch ein Abfall der Expression initiiert wurde. (B) Die Western Blot Analysen der entsprechenden Zelllysate verifizierten die unter (A) beschriebenen Ergebnisse. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Die mRNA-Expression von TGF- β 1 wurde durch die CTGF-Behandlung konzentrationsabhängig erhöht. Diese Werte waren signifikant bzw. hochsignifikant. (5 ng/ml CTGF: $1,27 \pm 0,13$, $p = 0,04$, $n = 9$; 50 ng/ml CTGF: $1,80 \pm 0,32$; $p = 0,01$, $n = 6$; 100 ng/ml CTGF: $1,97 \pm 0,20$, $p = 1,2 \times 10^{-05}$, $n = 3$) (Abbildung 4-10A). Für die Banden der zugehörigen Proteinanalysen für TGF- β 1 konnte ebenfalls eine höhere Intensität im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Hierbei war die Synthese von TGF- β 1 nach der 50 ng/ml CTGF-Behandlung signifikant um das $1,39 \pm 0,11$ -fache ($p = 0,02$, $n = 3$) und nach 100 ng/ml hochsignifikant um das $1,77 \pm 0,13$ -fache ($p = 0,007$, $n = 3$) gesteigert (Abbildung 4-10B).

Für TGF- β 2 konnte auch eine dosisabhängige Erhöhung der mRNA-Konzentration verzeichnet werden, die bei 50 ng/ml und 100 ng/ml CTGF zu einem hochsignifikanten Anstieg der Expression führte (5 ng/ml CTGF: $1,33 \pm 0,37$; 50 ng/ml CTGF: $1,84 \pm 0,30$, $p = 0,004$, $n = 5$; 100 ng/ml CTGF: $1,93 \pm 0,27$, $p = 0,0008$, $n = 5$) (Abbildung 4-10A) und sich auch in einer gesteigerten Synthese des Wachstumsfaktors widerspiegelte (5 ng/ml CTGF: $1,21 \pm 0,43$; 50 ng/ml CTGF: $1,7 \pm 0,21$, $p = 0,002$, $n = 10$; 100 ng/ml CTGF: $1,89 \pm 0,26$, $p = 8,11 \times 10^{-06}$, $n = 3$) (Abbildung 4-10B).

Die Untersuchungen zur Autoinduktion von CTGF bestätigten unsere früheren Experimente an primären humanen TW-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung mit 5 ng/ml und 50 ng/ml CTGF führte zu einer signifikanten Erhöhung der CTGT-Transkription (5 ng/ml: $1,30 \pm 0,18$, $p = 0,03$, $n = 8$; 50 ng/ml: $1,59 \pm 0,24$, $p = 0,00$, $n = 5$), während bei 100 ng/ml CTGF-, verglichen zur 50 ng/ml CTGF-Behandlung, ein Abfall der mRNA festzustellen war (Abbildung 4-10A). Eine signifikante bzw. hochsignifikante Erhöhung der Proteinmenge von CTGF bestätigten die Daten der Expressionsanalyse (5 ng/ml CTGF: $1,24 \pm 0,09$; $p = 0,05$, $n = 3$; 50 ng/ml CTGF: $1,47 \pm 0,13$, $p = 0,02$, $n = 3$; 100 ng/ml: $1,51 \pm 0,17$, $p = 0,04$, $n = 3$) (Abbildung 4-10B).

4.1.2.2.1 Erk-Signalweg vermittelt die Induktion von TGF- β 1 und -2

In unserer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass die CTGF-Effekte über den RhoA/ROCK– und den Erk–Signalweg vermittelt werden (Junglas *et al.*, 2012). Um zu klären, welche Signalwege für den Anstieg der beiden TGF- β -Isoformen verantwortlich sein könnten, wurden *in vitro*-Versuche mit HTM-N-Zellen durchgeführt. Für die Hemmung des Signalweges der Erk1/2-Kinase wurde ein selektiver Inhibitor dieser Proteinkinasen, die auch als Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (Mek1/2-Inhibitor) bezeichnet werden, verwendet. Bei der Blockierung des Signalweges der kleinen GTPase RhoA kam Fasudil, ein spezifischer Hemmer der Rho-assoziierten Protein Kinase (ROCK), zum Einsatz. Durch die Hemmung des Erk-Signalwegs mit dem spezifischen Mek1/2-Inhibitors sollte überprüft werden, ob die CTGF-vermittelte erhöhte TGF- β 1 und 2 Expression durch diesen Signalweg erfolgt. Dazu wurden HTM-N-Zellen für 1 h mit dem Inhibitor präinkubiert, bevor sie mit 50 ng/ml CTGF behandelt wurden. Die Kontrollzellen wurden nur mit der Trägersubstanz des Inhibitors (DMSO) versetzt. Die Evaluation der TGF- β 1-mRNA nach Behandlung mit dem Mek1/2-Inhibitor allein führte zu einer verminderten Expression ($0,56 \pm 0,20$, $p = 0,01$, $n = 3$), während die CTGF Inkubation wiederum eine hochsignifikante Induktion von TGF- β 1 ($1,82 \pm 0,26$, $p = 0,01$; $n = 7$) bestätigte. In der Kombinationsbehandlung des Mek1/2-Inhibitors mit CTGF konnte der Anstieg der TGF- β 1-mRNA hochsignifikant blockiert werden ($p = 0,01$). Die TGF- β 1 Expression blieb auf dem Level der Mek1/2-Inhibition und zeigte gegenüber der Kontrolle eine vergleichbare Reduktion ($0,64 \pm 0,16$, $p = 0,02$; $n = 4$) (Abbildung 4-11A).

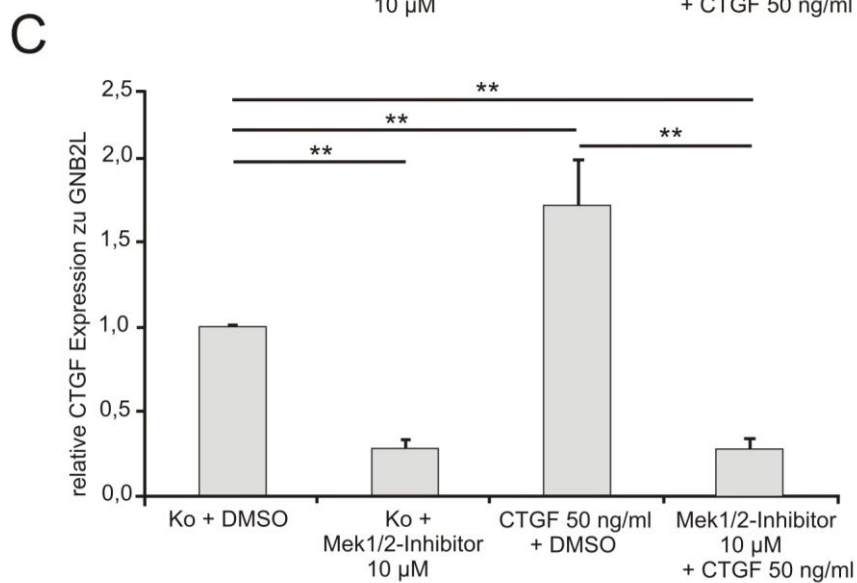
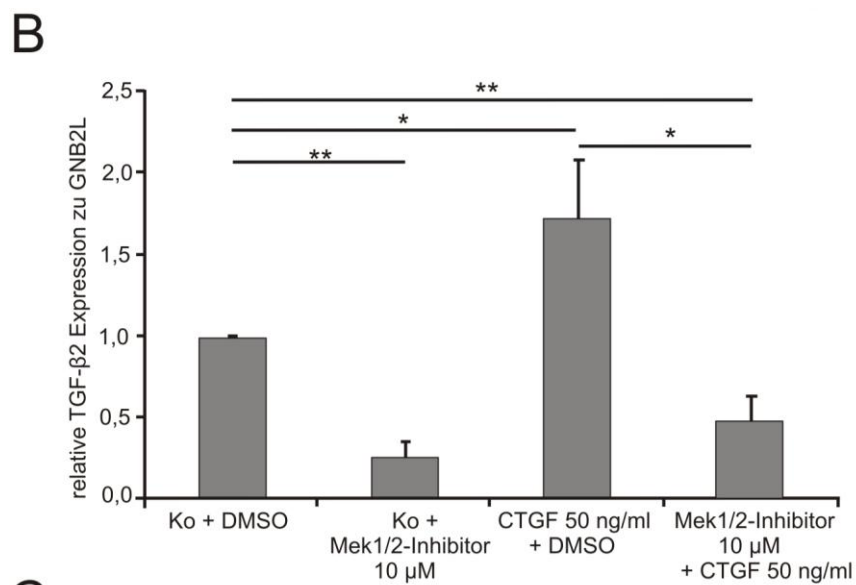
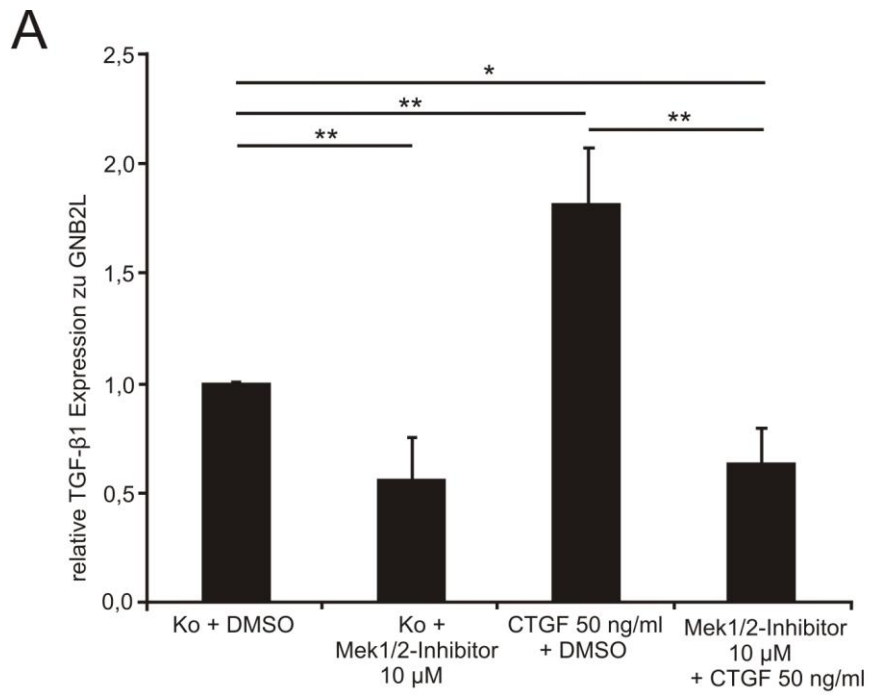


Abbildung 4-11: **Der Erk-pathway war verantwortlich für die durch CTGF-vermittelte Induktion der mRNA- und Protein-Level von TGF- β 1, TGF- β 2 und CTGF selbst.** Die Resultate der quantitativen Real-Time RT-PCR für den mRNA-Gehalt von TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B) und CTGF (C) ergaben eine vergleichbare Regulation durch den Mek1/2-Inhibitor, was die Annahme untermauerte, dass der Erk-Signalweg verantwortlich für die CTGF-induzierte Modulation des Transkriptionsgrades der untersuchten Wachstumsfaktoren war. Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Der Einsatz des Mek1/2-Hemmers erniedrigte auch das TGF- β 2-mRNA-Level hochsignifikant um 84 % ($0,26 \pm 0,10$, $p = 2,75 \times 10^{-06}$, $n = 4$) im Vergleich zu den nur mit DMSO behandelten Zellen, während CTGF das Expressionslevel von TGF- β 2 positiv beeinflusste ($1,73 \pm 0,37$, $p = 0,03$, $n = 5$). Dieser durch CTGF-vermittelte Effekt konnte durch die Inhibition des Erk-Signalwegs signifikant verhindert werden ($p = 0,04$). Gegenüber der Kontrolle erwirkte die Behandlung von Mek1/2-Inhibitor mit CTGF eine hochsignifikante Erniedrigung um 53 % ($0,47 \pm 0,16$, $p = 0,0015$, $n = 4$), während bei der alleinigen Inkubation des Mek1/2-Inhibitors, verglichen zur Kombinationsbehandlung mit CTGF, keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte ($p = 0,3$) (Abbildung 4-11B).

Abschließend sollten die Auswirkungen auf CTGF selbst kontrolliert werden (Abbildung 4-11C). Die Autoinduktion des Wachstumsfaktors wurde auch hier, gegenüber der Kontrolle, durch die Kombinationsbehandlung hochsignifikant minimiert ($0,30 \pm 0,06$, $p = 5,0 \times 10^{-07}$, $n = 5$). Die Induktion durch die Behandlung mit CTGF war ebenfalls als hochsignifikant zu betrachten und belief sich auf einen Anstieg von 70 % ($1,70 \pm 0,27$, $p = 0,01$, $n = 4$) gegenüber den Kontrollzellen. Durch die alleinige Blockierung des Erk-Signalwegs wurde die mRNA-Menge von CTGF ebenfalls hochsignifikant gehemmt ($0,31 \pm 0,05$, $p = 4,0 \times 10^{-08}$, $n = 6$).

Um zu überprüfen, ob diese reduzierte Transkription auch zu einer Inhibition der Translation führt, wurden zusätzlich die Proteinlevels via Western Blot Analyse untersucht. Da die Aufklärung des verantwortlichen Signalwegs für die CTGF-vermittelte Induktion der beiden Isoformen von TGF- β im Vordergrund stand, konzentrierte man sich hier auf die Analyse von TGF- β 1 und -2 (Abbildung 4-12).

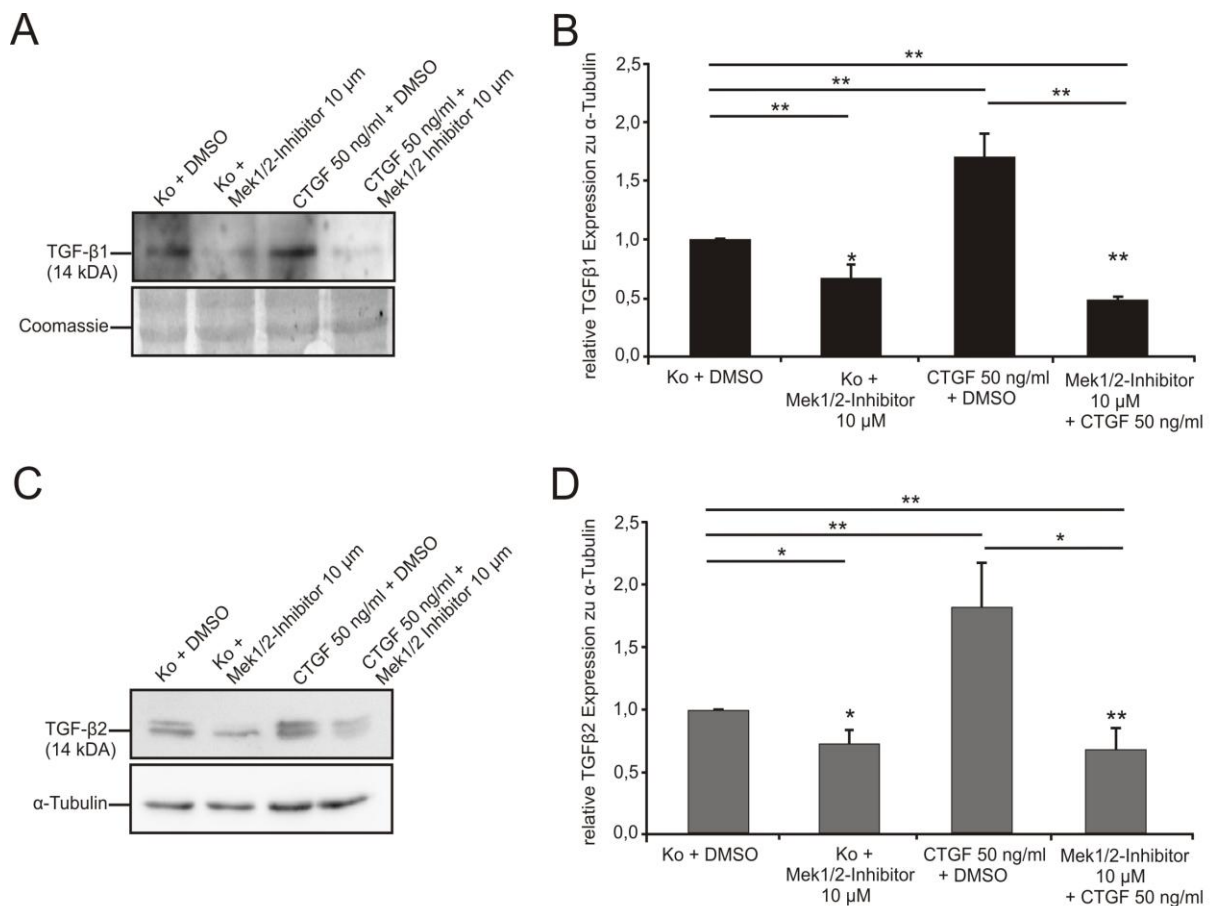


Abbildung 4-12: **Der Erk-pathway ist verantwortlich für die durch CTGF-vermittelte Induktion der Protein-Level von TGF- β 1 und -2.** (A) Western Blot Analyse der HTM-N-Zellinhibitionsversuchen für den Erk-Signalweg mit einem spezifischen Antikörper gegen TGF- β 1. Als Ladungsausgleich diente hier α -Tubulin. (C) Western Blot Analyse der HTM-N-Zellinhibitionsversuchen für den Erk-Signalweg mit einem spezifischen Antikörper gegen TGF- β 2. Als Ladungsausgleich diente hier die Coomassie-Färbung. (B) und (D). Die Densitometrie der unter (A) und (C) untersuchten *in vitro*-Versuche verifizierten die Resultate für die Untersuchungen des mRNA-Gehalts (Abbildung 4-11). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Sowohl die Intensität der Western Blot Banden als auch die densitometrische Auswertung zeigten, dass die Menge an TGF- β 1 und -2 gegenüber der Kontrolle durch die Verwendung des Mek1/2-Inhibitors signifikant um 33 % bzw. 28 % herunterreguliert wurde (TGF- β 1: $0,67 \pm 0,14$, $p = 0,009$, $n = 4$; TGF- β 2: $0,72 \pm 0,13$, $p = 0,02$, $n = 6$), wohingegen die CTGF-Behandlung wiederum positive Eigenschaften auf die Proteinmenge von TGF- β 1 und -2 hatte (TGF- β 1: $1,71 \pm 0,20$, $p = 0,002$, $n = 10$; TGF- β 2: $1,82 \pm 0,37$, $p = 0,0007$, $n = 3$). Diese Ergebnisse waren hochsignifikant. Wie bei der mRNA-Analyse wurde die durch CTGF-vermittelte Induktion durch den vor der CTGF-Behandlung verwendeten Mek1/2-Hemmers signifikant bzw. hochsignifikant verhindert (TGF- β 1: $p = 0,0004$; TGF- β 2: $p = 0,05$). Gegenüber der Kontrolle bedeutete dies ein hochsignifikanter Rückgang

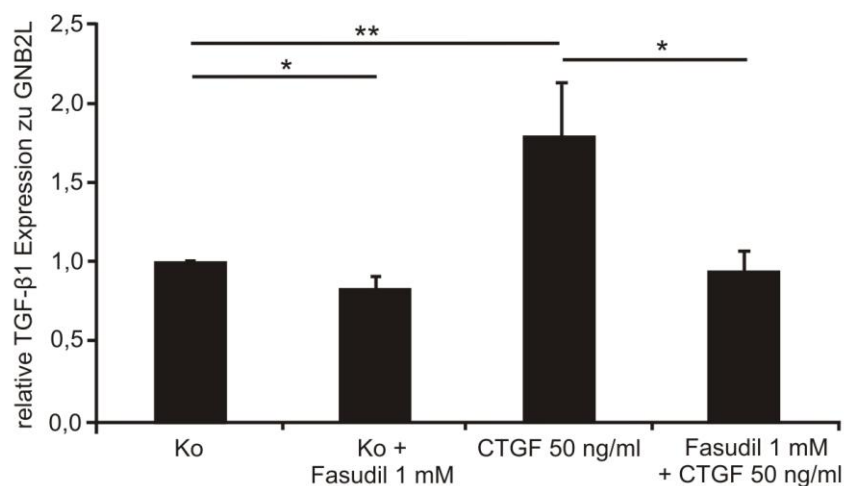
von TGF β 1 und -2 nach Kombinationsbehandlung des Mek1/2-Inhibitors zusammen mit CTGF (TGF- β 1: $0,49 \pm 0,04$, $p = 9,5 \times 10^{-09}$, $n = 5$; TGF- β 2: $0,67 \pm 0,18$, $p = 0,01$, $n = 3$) (Abbildung 4-12A und B).

Insgesamt deuten die Daten daraufhin, dass der von CTGF-abhängige Anstieg von TGF- β 1 und -2 durch den Erk-Signalweg vermittelt wird, da CTGF nach Inhibition dieses Signalwegs nicht mehr potent genug war, den Anstieg der Wachstumsfaktoren zu induzieren.

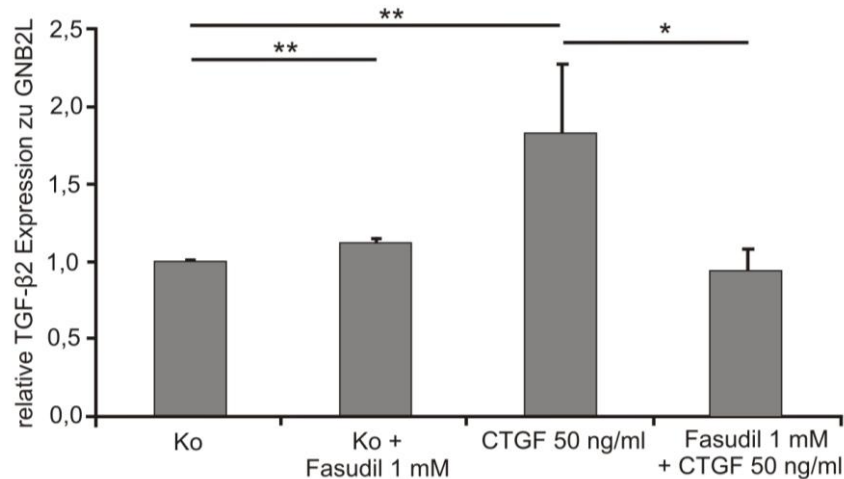
4.1.2.2.2 Inhibition des RhoA/ROCK-Signalwegs blockiert den CTGF-vermittelten Anstieg von TGF- β 1 und -2

Um Auswirkungen des RhoA/ROCK-Signalwegs auf die durch CTGF-vermittelte Induktion von TGF- β 1, -2 und CTGF zu analysieren, wurde Fasudil verwendet. Fasudil ist ein spezifischer Hemmer der ROCK-Kinase, wodurch die Signalantwort von RhoA unterbunden werden kann. Dieser Inhibitor wurde ebenfalls 1h vor der CTGF-Behandlung (50 ng/ml) den HTM-N-Zellen in einer Konzentration von 1mM hinzugefügt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit CTGF oder Fasudil inkubiert. Es zeigte sich, dass Fasudil allein nur einen geringen, aber dennoch hochsignifikanten Effekt auf die Expression von TGF- β 1 ($0,82 \pm 0,08$, $p = 0,02$, $n = 7$) hatte. Die Behandlung von CTGF führte wiederum zu einer hochsignifikanten Induktion von TGF- β 1 ($1,80 \pm 0,34$, $p = 0,01$, $n = 6$), die durch die Präinkubation mit Fasudil verhindert wurde ($p = 0,05$) (Abbildung 4-13A).

A



B



C

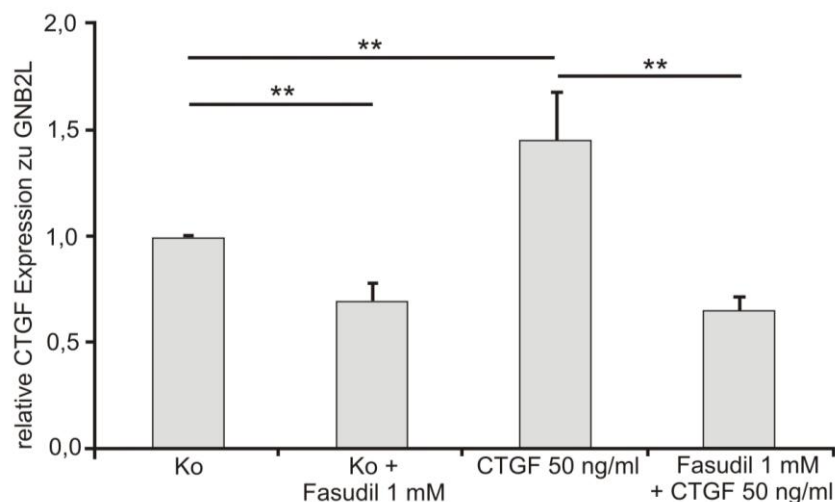


Abbildung 4-13: **Der RhoA/ROCK-Signalweg hatte auch Einfluss auf die Regulation der CTGF-vermittelten TGF-β1-, TGF-β2- und der Auto-Induktion von CTGF.** (A), (B) und (C) Die quantitative Real-Time RT-PCR für TGF-β1, -2 und CTGF verifizierten, dass der RhoA/Rock-Signalweg ebenso eine Rolle bei der Modulation der Transkription der beiden TGF-β-Isoformen spielt, wie der Erk-Signalweg. Der alleinige Einsatz von Fasudil führte jedoch nur bei der Expression von CTGF zu einer prägnanten Reduktion des mRNA-Gehalts ($0,70 \pm 0,10$, $p = 0,0001$, $n = 6$). Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

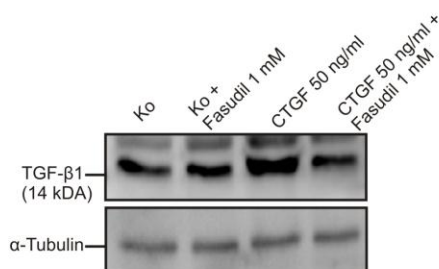
Für die Modulation von TGF-β2 konnten ähnliche Effekte festgestellt werden. Die Inkubation von CTGF implizierte einen hochsignifikanten Anstieg der TGF-β2-Expression um 84 % ($1,84 \pm 0,30$, $p = 0,01$, $n = 5$), während dieser durch den

Wachstumsfaktor positive Effekt auf die TGF- β 2-Transkription durch die Präinkubation mit dem ROCK-Kinase-Hemmer signifikant abgeblockt werden konnte ($p = 0,04$). Die alleinige Behandlung mit Fasudil hatte, verglichen mit der Kontrolle, keinen weitgehenden Einfluss auf den mRNA-Gehalt von TGF- β 2 ($1,12 \pm 0,05$, $p = 0,01$, $n = 4$). Diese Beobachtung wurde als hochsignifikant bewertet (Abbildung 4-13B).

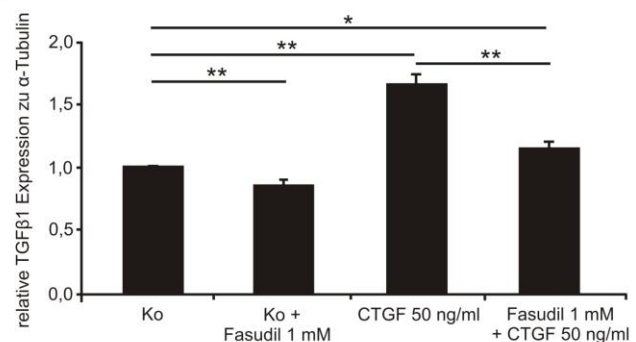
Die Menge an CTGF-mRNA wurde durch den Einsatz von Fasudil hochsignifikant um 30 % ($0,70 \pm 0,10$, $p = 0,0001$, $n = 6$) herabgesetzt. Nach Behandlung mit 50 ng/ml des Wachstumsfaktors konnte wiederum ein autoinduktiver Effekt beobachtet werden. Hier wurde die Expression hochsignifikant um 46 % ($1,46 \pm 0,24$, $p = 0,006$, $n = 6$) gegenüber den Kontrollzellen gesteigert. Wie bei den anderen untersuchten Genen konnte diese Erhöhung ebenfalls durch Fasudil blockiert werden ($p = 0,01$) (Abbildung 4-13C).

In der Proteinanalyse bestätigte sich die densitometrische Evaluation für TGF- β 1 und -2. Fasudil allein hatte keine prägnanten Auswirkungen auf die Translation der beiden untersuchten Proteine. Es zeigte sich nur eine leicht schwächere Bandenintensität verglichen zur Kontrolle (TGF- β 1: $0,86 \pm 0,04$, $p = 0,01$, $n = 3$; TGF- β 2: $0,80 \pm 0,11$, $p = 0,04$, $n = 8$) (Abbildung 4-14).

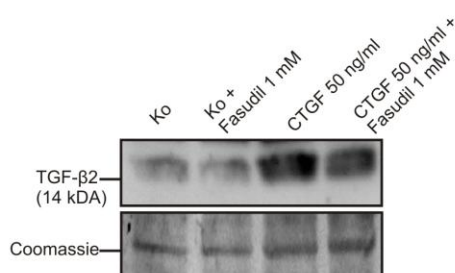
A



B



C



D

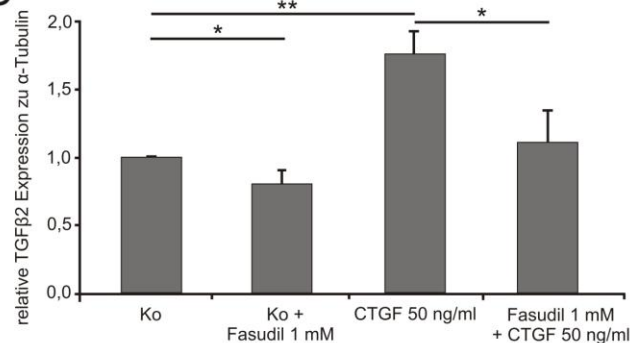


Abbildung 4-14: **Die Proteinsynthese von TGF- β 1 und -2 wurde nach Inhibition des RhoA/ROCK-Signalweges minimiert.** (A) und (C) Western Blot Analysen der HTM-N-Zellinhibitionsversuche für den RhoA/ROCK-Signalweg mit einem spezifischen Antikörper gegen TGF- β 1 und -2. Als Ladungsausgleich diente bei der Analyse für TGF- β 1 ein Antikörper gegen α -Tubulin und bei TGF- β 2 die Färbung mit Coomassie. (B) und (D) Die densitometrische Auswertung unterstützte die Annahme einer Beteiligung des RhoA/ROCK-Signalwegs bei der CTGF-vermittelten Induktion von TGF- β 1 und -2. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Die Gabe von CTGF nach einer 24-stündigen serumfreien Phase führte jedoch wiederum zu einer hochsignifikanten Steigerung der Synthese der Wachstumsfaktoren (TGF- β 1: $1,67 \pm 0,08$; $p = 0,0003$; $n = 13$; TGF- β 2: $1,76 \pm 0,17$, $p = 0,00$, $n = 7$), welche durch die Präinkubation mit Fasudil für TGF- β 1 hochsignifikant ($p = 0,009$) und für TGF- β 2 signifikant ($p = 0,05$) blockiert werden konnte (Abbildung 4-14).

4.1.2.3 Anstieg der TGF- β -Signalantwort durch CTGF

Die unterschiedlichen Isoformen von TGF- β liegen oft in einer latenten Form vor (Lawrence 2001). Deshalb wurde im nächsten Arbeitsschritt überprüft, ob die erhöhten Konzentrationen von TGF- β 1 und -2 zu einer gesteigerten Signalantwort beitragen. Für die Analyse wurde der Phosphorylierungsgrad von Smad2 und -3 bestimmt. Diese beiden phosphorylierten Smad Proteine sind repräsentativ für einen aktivierten TGF- β -Signalweg. Die eventuell durch CTGF beeinflusste Smad2 und -3 Expression wurde mittels quantitativer Real-Time RT PCR aus den VAA von TG- und WT-Tieren bestimmt (Abbildung 4-15A).

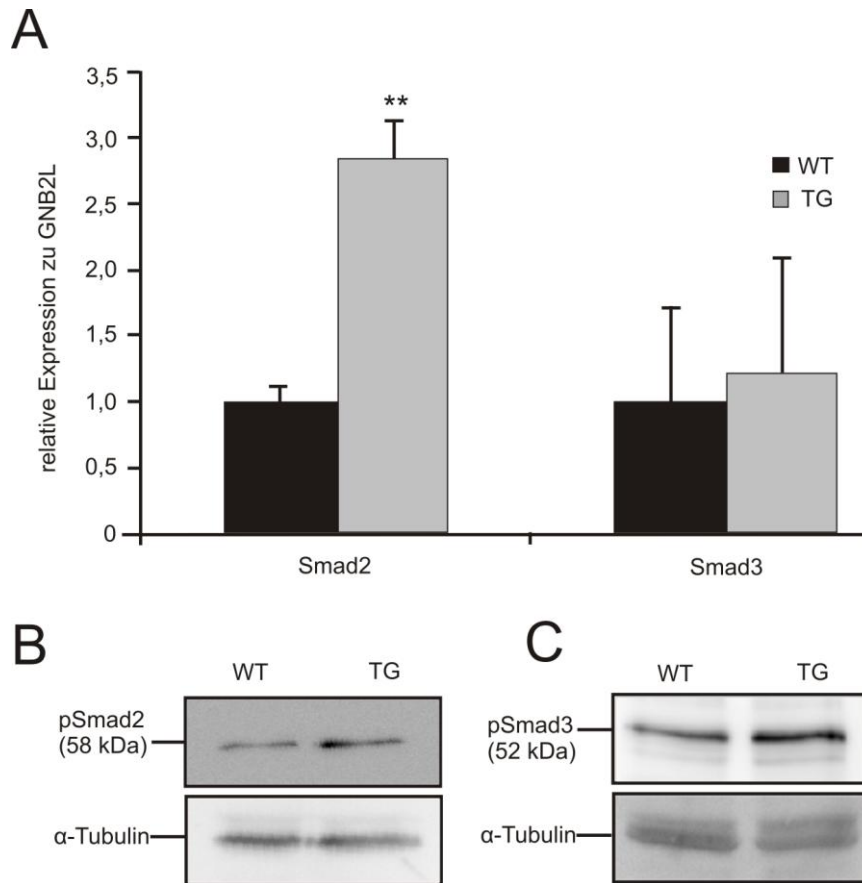


Abbildung 4-15: **CTGF hat einen positiven Einfluss auf die Signalantwort von TGF-β in 8 Wochen alten βB1-Mäusen.** (A) Der mRNA-Gehalt von Smad2 war im TG-Tier gegenüber dem WT signifikant hochreguliert ($2,85 \pm 0,33$, $p = 0,01$, $n = 4$), während Smad3 durch CTGF nur leicht angehoben wurde ($1,21 \pm 0,078$). Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. (B) und (C) Die Western Blot Analyse, von VAA 8 Wochen alter Tiere, ergab eine hochsignifikant erhöhte Phosphorylierung von Smad2 ($1,84 \pm 0,27$, $p = 0,006$, $n = 6$) und Smad3 ($1,85 \pm 0,21$, $p = 0,001$, $n = 7$) im Vergleich zum Kontrolltier. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Die basale mRNA-Konzentration von Smad2 war verglichen mit den WT in den TG-Tieren hochsignifikant erhöht ($2,85 \pm 0,33$, $p = 0,01$, $n = 4$), während die endogene Expression von Smad3 nur leicht durch CTGF moduliert wurde (Abbildung 4-15A). Die Western Blot Analyse zeigte, dass tatsächlich eine vermehrte TGF-β Antwort in den TG- verglichen mit den WT-Tieren vorliegt. Es konnte ein Anstieg der Phosphorylierung für Smad2 und Smad3 detektiert werden (pSmad2: $1,84 \pm 0,27$, $p = 0,006$, $n = 6$; pSmad 3: $1,85 \pm 0,21$, $p = 0,001$, $n = 7$) (Abbildung 4-15B und C). Bei der immunhistochemischen Betrachtung von pSmad2 im VAA wurde eine konstitutive Aktivität des TGF-β-Signalwegs festgestellt (Abbildung 4-16 links).

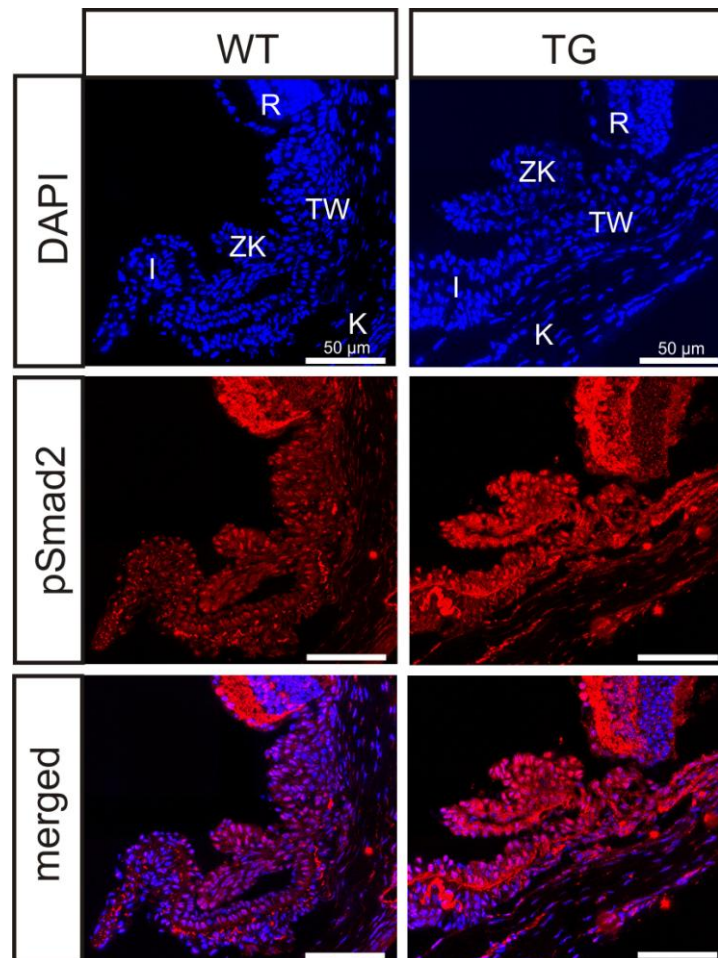


Abbildung 4-16: **CTGF führt zu einem erhöhten pSmad2-Spiegel im VAA von 8 Wochen alten transgenen Tieren.** Im Ziliarkörper (ZK), der Iris (I) und dem Trabekelwerk (TW) konnte eine positive Färbung für das Signalmolekül des TGF- β -Signalwegs verifiziert werden. In den TG-Tieren wurde im Vergleich zu den WT ein erhöhter Spiegel des Signalmoleküls beobachtet. ZK: Ziliarkörper, TW: Trabekelwerk, K: Kornea, I: Iris, R: Retina, Blau: DAPI, Rot: pSmad2, Maßstabsbalken: 50 μ m.

So konnte das Signalmolekül im Ziliarkörper, der Iris und dem TW lokalisiert werden. Die vergleichende Analyse mit den TG-Tieren impliziert jedoch einen deutlichen Anstieg der Signalintensität in den VAA (Abbildung 4-16 rechts).

4.1.3 Auswirkungen von CTGF auf die inhibitorischen Smad Proteine (Smad6 und -7)

Die inhibitorischen Smads (I-Smads) sind wichtige Bestandteile in der Regulation des BMP- und des TGF- β -Signalwegs. Smad6 ist zuständig für die Hemmung der BMP Antwort, während Smad7 in beide Signalwege kontrollierend eingreifen kann. Jedoch ist die Affinität von Smad7 hauptverantwortlich für die Inhibition der TGF- β -Signalkaskade (Fuchshofer *et al.*, 2009). Deshalb war es interessant zu evaluieren,

ob die konstitutive Expression von CTGF im VAA der TG-Mäuse die Expression und Synthese der I-Smads moduliert.

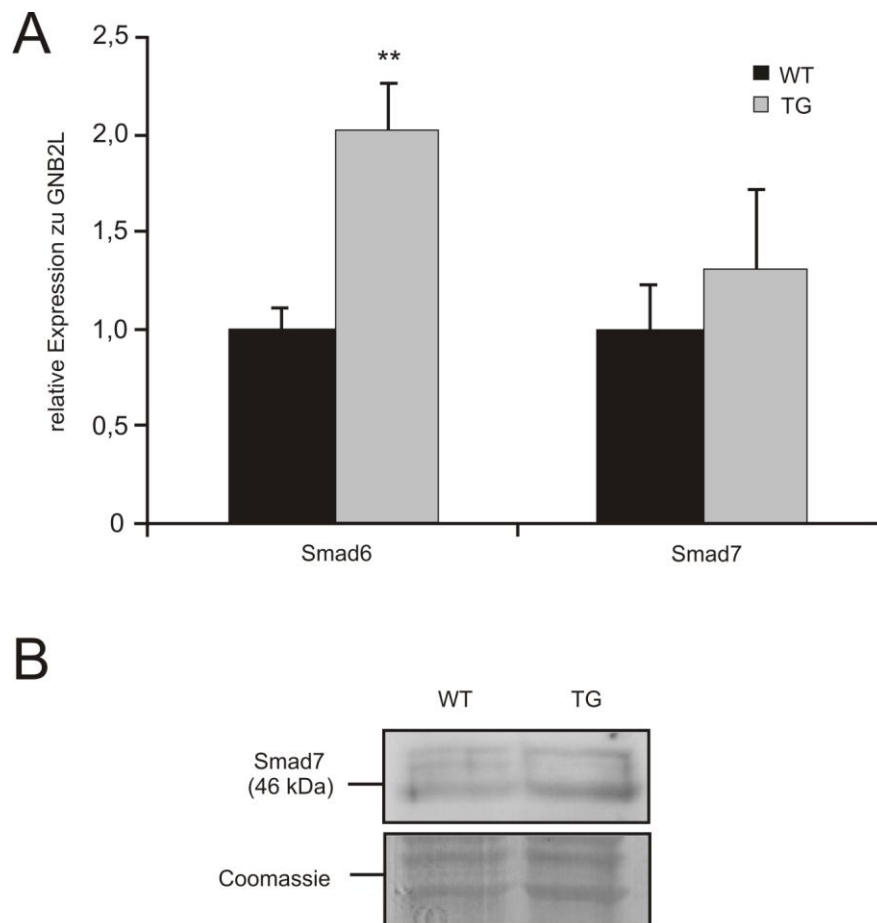


Abbildung 4-17: **Induktion der mRNA-Expression von Smad6 durch CTGF in 2 Monate alten TG-Mäusen.**

(A) Die quantitative Real-Time RT-PCR ließ erkennen, dass Smad6 im TG-Tier gegenüber den WT durch CTGF hochsignifikant hochreguliert wurde ($2,04 \pm 0,19$, $p = 0,005$, $n = 18$). Smad7 wurde, im Gegensatz zu Smad6, durch CTGF nur leicht beeinflusst. Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. (B) Western Blot Analyse für den Proteingehalt von Smad7 in 2 Monate alten Tieren. Die Intensität der Banden zeigte keine enormen Unterschiede. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

CTGF wies einen hochsignifikanten Einfluss auf die Synthese der Smad6-mRNA ($2,04 \pm 0,19$, $p = 0,005$, $n = 18$) auf, während Smad7 von der CTGF-Überexpression nur leicht modifiziert wurde (Abbildung 4-17A).

In der Western Blot Analyse für den Proteingehalt von Smad7, nach 8-wöchiger CTGF-Exposition in den VAA von TG-Tieren, ließ sich kein Unterschied im Vergleich mit den WT ($1,08 \pm 0,18$) erkennen.

4.2 Analyse der Effekte von CTGF im hinteren Augenabschnitt

Nachdem im ersten Abschnitt dieser Arbeit geklärt wurde, dass das homöostatische Gleichgewicht zwischen TGF- β und den BMPs durch die Exposition von CTGF im VAA der TG-Mäuse gestört ist, wurde im zweiten Teil der Arbeit die Auswirkung einer CTGF-Überexpression auf den BMP-Signalweg und das Überleben der retinalen Ganglienzellen (RGZ-Zellen) im hinteren Augenabschnitt (HAA) untersucht.

Für die *in vivo*-Untersuchungen am HAA wurden ausschließlich β B1-CTGF-Mäuse (TG) im Alter von 8 Wochen verwendet. Als Kontrolle dienten dabei die wildtypischen Geschwistertiere (WT). Zu diesem Zeitpunkt wiesen diese Tiere einen signifikant erhöhten IOD und einen signifikanten Verlust von Axonen auf. Für die Experimente zur Analyse der Effekte auf die Zellviabilität der RGZ-Zellen wurden zusätzlich Experimente an CD1-WT-Tieren im Alter von 10-12 Wochen durchgeführt. Des Weiteren werden bei diesem Abschnitt der Arbeit, Ergebnisse, die im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Bianca Dauner gemeinsam generiert wurden, vorgestellt.

4.2.1 Auswirkungen von CTGF auf den BMP- und TGF- β -Signalweg

Zu Beginn dieser Studie wurde untersucht, ob RGZ-Zellen ebenfalls einen konstitutiv aktiven BMP-Signalweg aufweisen und ob der beobachtete inhibierende Effekt von CTGF auf den BMP-Signalweg im anterioren Bereich des Auges auch auf das posteriore Areal zu übertragen ist.

4.2.1.1 Inhibition des BMP-Signalwegs durch CTGF

Zuerst wurde diese Fragestellung basierend auf Zellkulturexperimenten mit Hilfe der immortalisierten 661-W-Zelllinie erläutert. Diese wurden als Modell gewählt, da sie die einzige immortalisierte neuronale Zelllinie aus der Retina darstellt (Krisnamoorthy *et al.*, 2013).

Bevor die 661-W-Zellen jedoch mit den rekombinanten humanen Proteinen CTGF und BMP4 bzw.-7 behandelt werden konnten, mussten die Zellen zuerst mittels dem Kinaseinhibitor Staurosporin ausdifferenziert werden, da zwischen primären und immortalisierten 661-W-Zellen morphologische und proliferative Unterschiede

präsent sind (Frassetto *et al.*, 2006). Die durch Staurosporin induzierte Ausdifferenzierung sichert die Anwendung der 661-W-Zelllinie als sinnvolles *in vitro*-Modell.

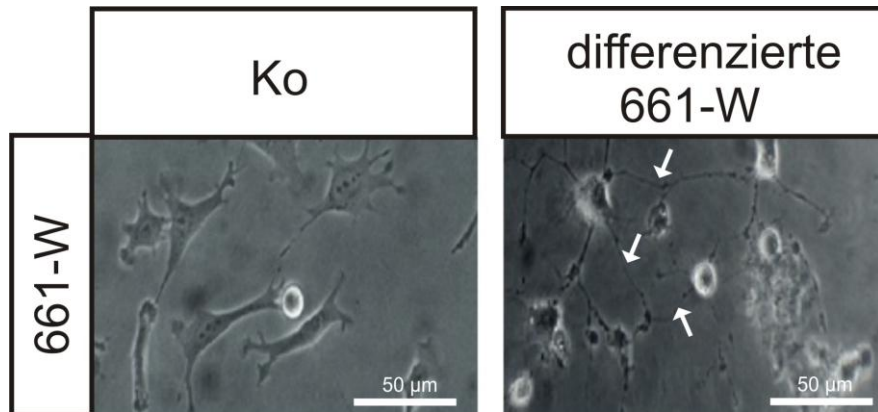


Abbildung 4-18: **Ausdifferenzierte 661-W-Zellen nach Inkubation von Staurosporin.** (Rechts) Nicht differenzierte 661-W-Zellen. (Links) Stadium der ausdifferenzierten 661-W-Zellen nach einstündiger Stimulation mit Staurosporin. Die Differenzierung führte zu einer deutlich veränderten Morphologie und zum Auswachsen zahlreicher Dendriten und Axone, was augenscheinlich das Aufnehmen von Zell-Zell-Kontakten der 661-W-Zellen vereinfachte (Pfeile). Maßstabsbalken: 50 µm.

Nach Inkubationszeit des Kinaseinhibitors wiesen die Zellen eine stark veränderte Morphologie auf. Es war eine Abrundung des Zellkörpers und das Auswachsen zahlreicher Dendriten und Axone zu beobachten, was auf eine erhöhte Anzahl an Zell-Zell-Kontakten hindeutete (Pfeile, Abbildung 4-18).

Nach Differenzierung wurden die 661-W-Zellen unter serumfreien Bedingungen für 24 h mit BMP7 (10 ng/ml), CTGF (50 ng/ml) und einer Kombination beider Faktoren behandelt. Um auf eine konstitutive Aktivität des BMP-Signalwegs in 661-W-Zellen zu testen, wurden die Zellen anschließend immunocytochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen pSmad1/5/8 gefärbt (Abbildung 4-19).

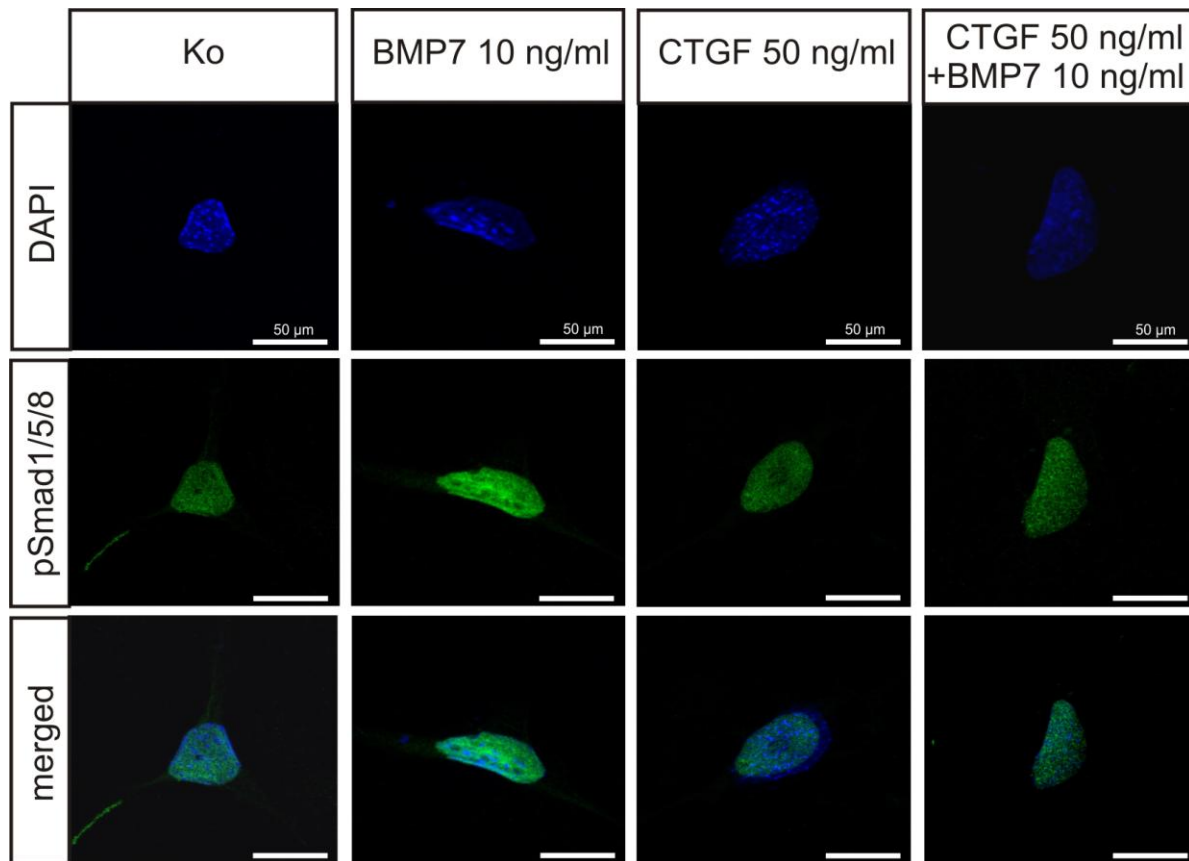


Abbildung 4-19: **Verifizierung einer konstitutiv aktiven BMP-Signalantwort und des auf diesen Signalweg hemmenden Effekts von CTGF in 661-W-Zellen.** Anhand der immunocytochemischen Färbung von mit BMP7 (10 ng/ml), CTGF (50ng/ml) und in Kombination beider behandelten 661-W-Zellen, mittels spezifischen Antikörpers gegen pSmad1/5/8, konnte ein grundsätzlich aktiver BMP-Signalweg registriert werden. Das Signal von pSmad1/5/8 wurde durch den Einsatz von BMP7 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen verstärkt, während die Intensität dieses Signals gegenüber der Kontrolle nach CTGF abgeschwächt wurde. Die Inkubation der beiden rekombinanten Proteine zusammen gleicht der BMP-Signalantwort in den unbehandelten Zellen. Blau: DAPI, Grün: pSmad1/5/8, Maßstabsbalken: 50 µm.

Bereits in unbehandelten Kontrollzellen war eine Färbung für das Signalmolekül des BMP-Signalwegs erkennbar. Die Signalintensität wurde nach Behandlung mit BMP7 gesteigert. Durch die Exposition mit CTGF konnte diese Signalantwort wiederum gehemmt werden. Das pSmad1/5/8-Signal glich dabei der Stärke der unbehandelten Kontrollzellen. Diese aus den *in vitro*-Analysen generierten Resultaten sollte *in vivo* geklärt werden. Zuerst wurde in TG- und WT-Tieren das Vorhandensein des BMP-Signalwegs in der Retina getestet (Abbildung 4-20A). Es zeigte sich, dass in den WT ein konstitutives Signal für pSmad1/5/8 zu verzeichnen war. Hauptsächlich konnte pSmad1/5/8 in der retinalen Ganglienzellschicht (GCL), also den RGZ-Zellen der Netzhaut, registriert werden. Des Weiteren war im Vergleich mit den Kontrolltieren auffällig, dass die Intensität der pSmad1/5/8-

spezifischen Färbung in den RGZ-Zellen der TG-Tiere signifikant reduziert war (Abbildung 4-20A):

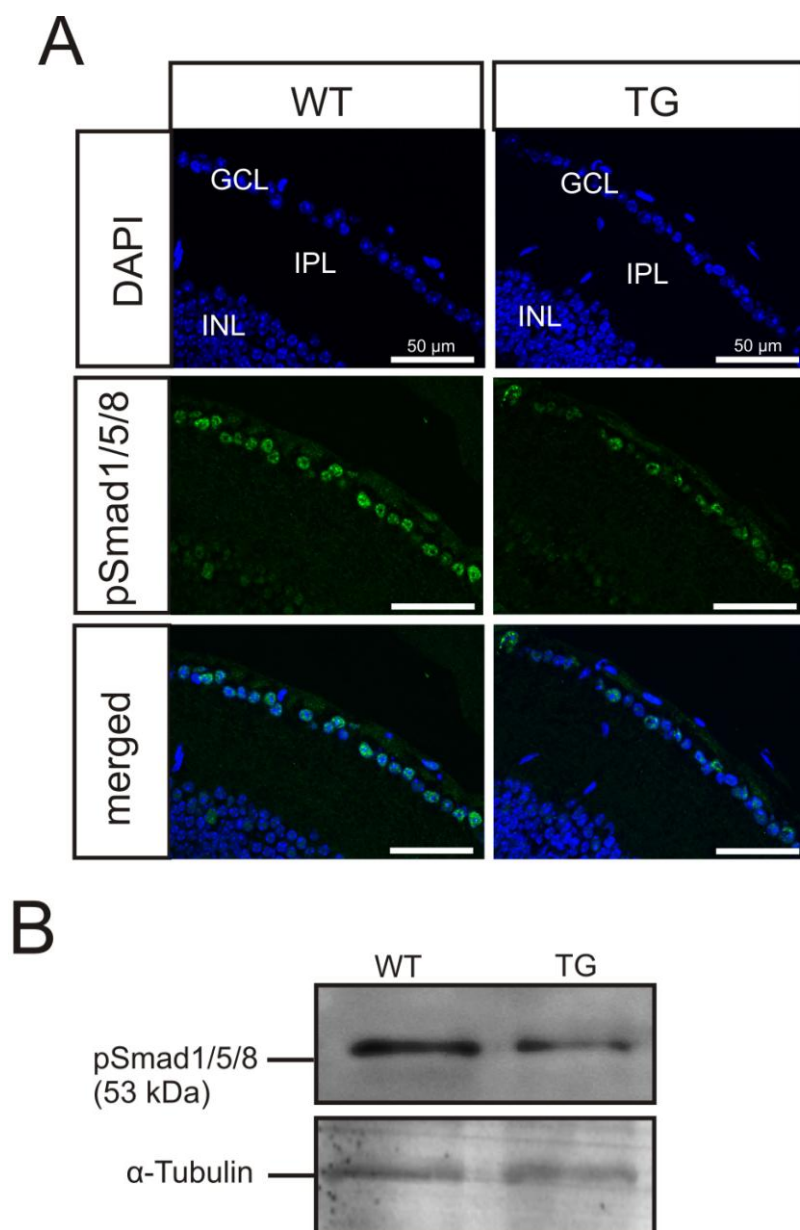
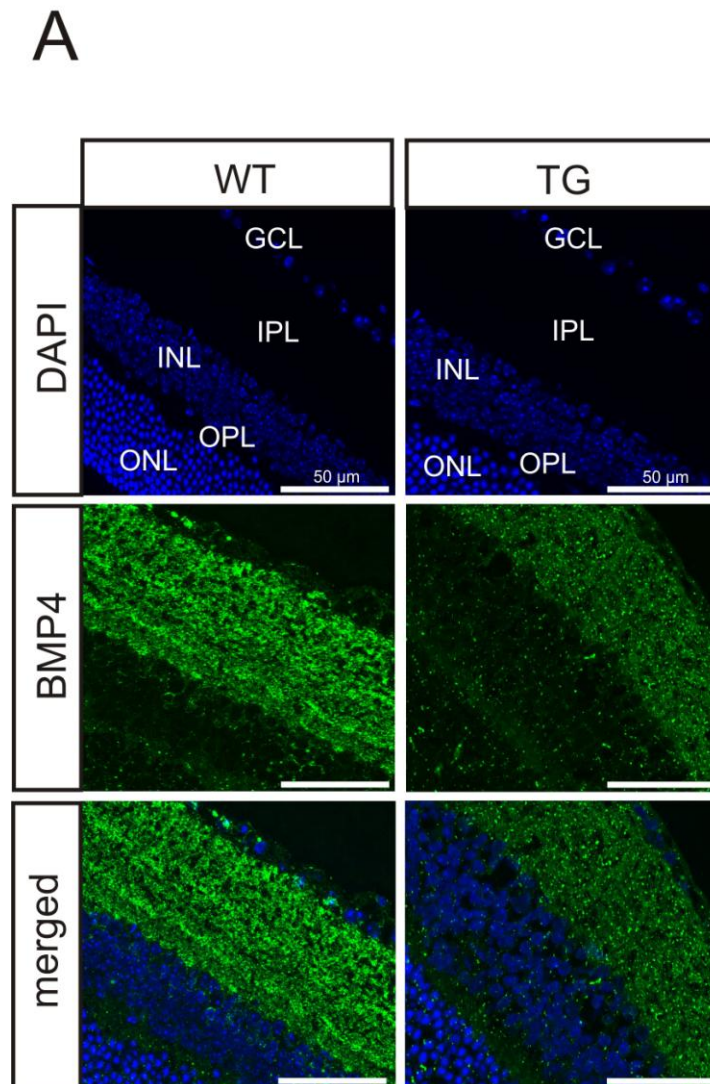


Abbildung 4-20: **Die Überexpression von CTGF in 8 Wochen alten β B1-Mäusen hemmte die BMP-Signalantwort.** (A) Immunhistochemische Färbung von Sagittalschnitten der HAA von 2 Monate alten TG- und WT-Tieren. In den WT konnte ein konstitutiv aktiver BMP-Signalweg in den RGZ-Zellen verzeichnet werden, das durch die Exposition von CTGF im TG-Tiere verglichen zu den WT signifikant reduziert war. GCL: Ganglienzellschicht; IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, Blau: DAPI, Grün: pSmad1/5/8, Maßstabsbalken: 50 µm. (B) Die Beobachtung aus (A) konnte durch eine Western Blot Analyse gegen pSmad1/5/8 des Zelllysats von gepoolten Retinae TG- und WT-Tiere bestätigt werden ($0,63 \pm 0,17$). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Um diesen Datenpunkt weiter zu überprüfen, wurde eine Western Blot Analyse gegen pSmad1/5/8 von Retinae 2 Monate alter CTGF-Überexpressionsmäuse und

deren WT-Geschwistertieren durchgeführt (Abbildung 4-20B). Die Bandenintensität im transgenen Tier war im Vergleich zum Kontrolltier auf $0,63 \pm 0,17$ minimiert, was die Inhibition des BMP-Signalwegs in der Netzhaut durch CTGF bestätigte.

Anschließend sollte die Lokalisation von BMP4 und -7 in der Retina durch immunhistochemische Färbung bestimmt werden (Abbildung 4-21).



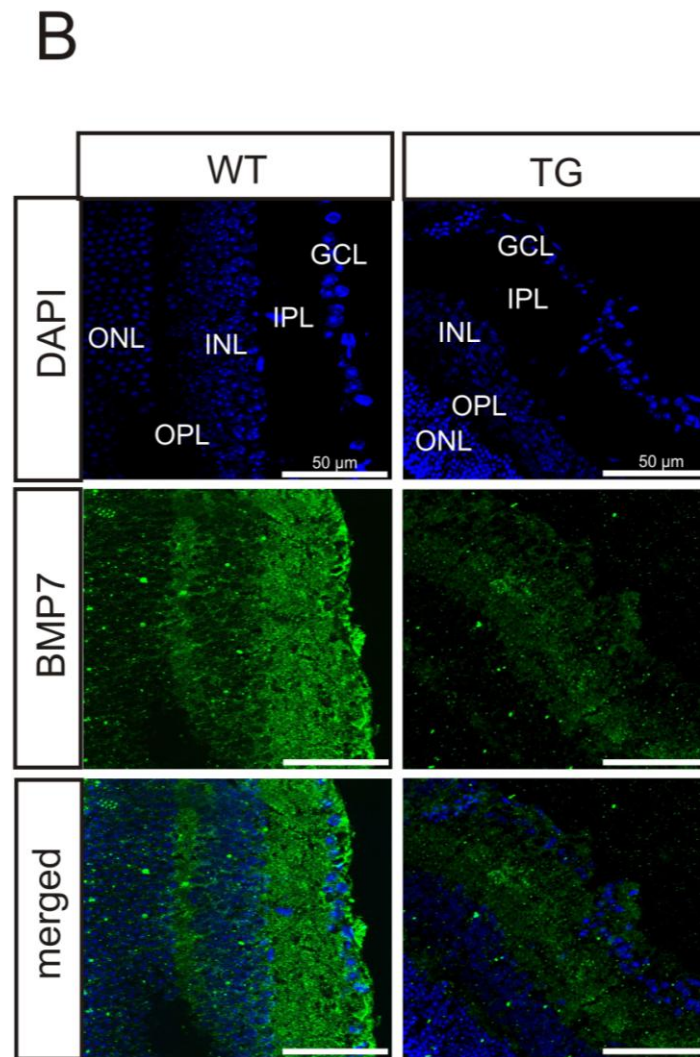


Abbildung 4-21: **Expressionmuster von BMP4 und -7 im HAA von WT- und TG-Tieren war unterschiedlich und signifikant reduziert.** (A) und (B) In der immunhistochemischen Färbung gegen BMP4 und -7 ließ sich die stärkste Expression für BMP4 im Bereich der inneren plexiformen Schicht (IPL) erkennen. BMP7 war in der Ganglienzellschicht (GCL), der inneren plexiformen Schicht und der äußeren plexiformen Schicht (OPL) lokalisiert. In den TG-Tieren konnte für beide BMP-Isoformen eine dramatische Reduktion der Signalintensität gegenüber den WT beobachtet werden. GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere nukleäre Schicht, Blau: DAPI, Grün: BMP4 bzw. BMP7, Maßstabsbalken: 50 µm.

Die BMP4-Färbung war vor allem in der inneren plexiformen Schicht (IPL) der Retina zu finden (Abbildung 4-21A links). Ein positives Signal für BMP7 konnte dagegen in drei Schichten der Netzhaut registriert werden, der Ganglienzellschicht (GCL), der IPL und der äußeren plexiformen Schicht (ONL) (Abbildung 4-21B links). In den TG-Tieren war die Intensität der Färbung für beide Isoformen der BMP-Isoformen verglichen mit der Färbung im WT drastisch reduziert (Abbildung 4-21A und B rechts). In weiteren Untersuchungen stand die Evaluation der Menge an

BMP4 und -7 der Retinae von TG- und WT-Mäusen mit Hilfe der quantitativen Real-Time RT PCR und der Western Blot Analyse im Vordergrund (Abbildung 4-22).

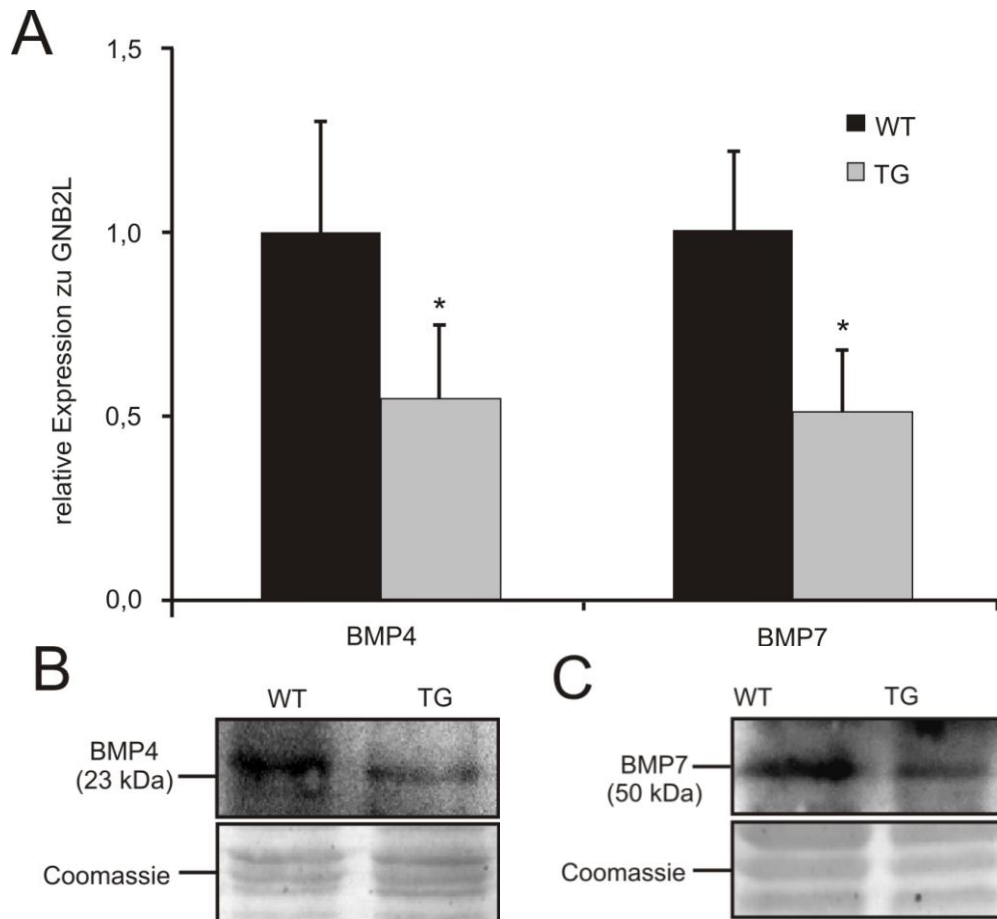


Abbildung 4-22: **Die CTGF Überexpression von 2 Monate alten Tieren führte zu einem mRNA- und Proteinexpressionsabfall von BMP4 und -7.** (A) Anhand der Graphen für die Regulation des mRNA-Levels für BMP4 und -7 konnte eine signifikante Reduktion beider BMPs in den Retinae TG-Tieren erfasst werden (BMP4: $0,54 \pm 0,21$, $p = 0,04$, $n = 7$; BMP7: $0,51 \pm 0,17$, $p = 0,02$, $n = 5$). Als Referenzgen zur Normierung der mRNA diente GNB2L. (B) und (C) Die Western Blot Analysen der TG- und WT-Netzhäute bestätigten die Ergebnisse für die BMP4 und -7 Transkription hochsignifikant (BMP4: $0,70 \pm 0,07$, $p = 0,01$, $n = 4$; BMP7: $0,63 \pm 0,08$, $p = 0,0007$, $n = 5$) Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

In der Retina konnte durch die CTGF-Überexpression ein deutlich negativer Einfluss auf den mRNA-Gehalt von BMP4 und -7 festgestellt werden. In beiden Fällen wurde die mRNA-Expression signifikant um etwa 50 % gegenüber dem basalen Level minimiert (BMP4: $0,54 \pm 0,21$, $p = 0,04$, $n = 7$; BMP7: $0,51 \pm 0,17$, $p = 0,02$, $n = 5$) (Abbildung 4-22A). Diese Daten wurden durch die entsprechende Proteinanalyse verifiziert (Abbildung 4-22 B und C). Die Translation wurde sowohl

für BMP4 ($0,70 \pm 0,07$; $p = 0,01$, $n = 4$) als auch für BMP7 ($0,63 \pm 0,08$, $p = 0,0007$, $n = 5$) hochsignifikant abgesenkt.

4.2.1.2 CTGF steigert die TGF- β -Signalantwort und inhibiert die Expression von Smad7

Um die Auswirkungen der CTGF-Überexpression auf den TGF- β -Signalweg in der Retina abschätzen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung gegen das Signalmolekül pSmad2 durchgeführt (Abbildung 4-23).

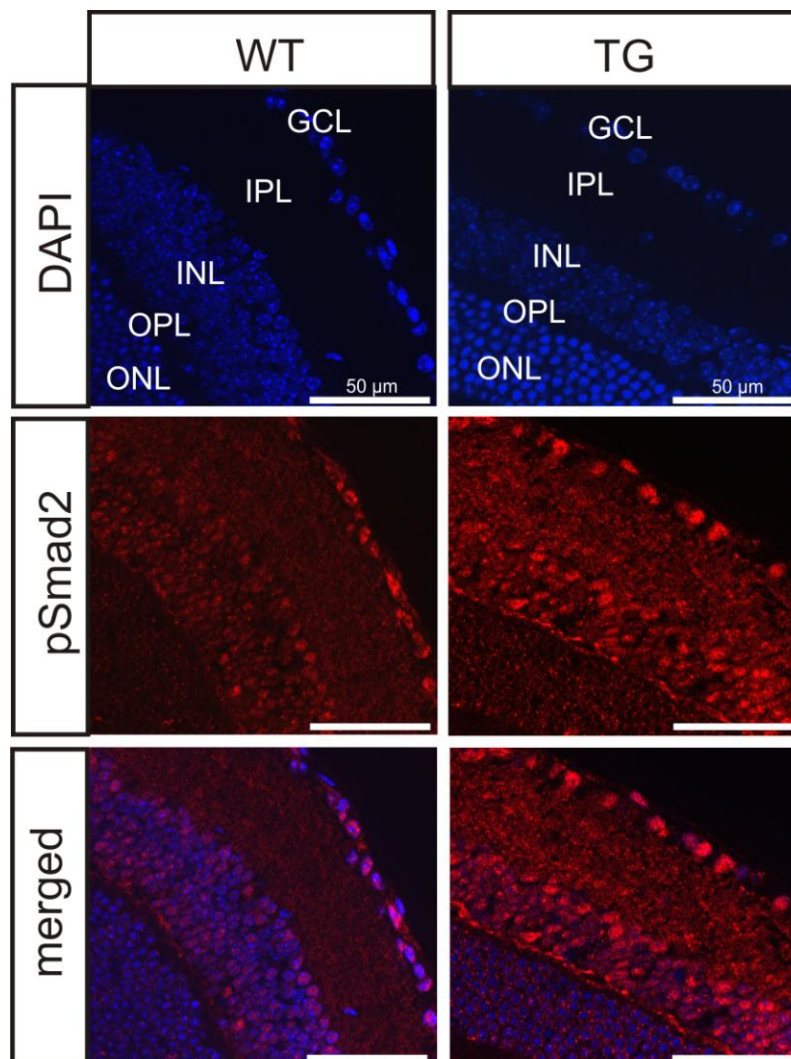


Abbildung 4-23: **CTGF induzierte eine höhere TGF- β -Signalantwort im posterioren Bereich der TG-Mäuse.** Im WT-Tier war pSmad2 in der Ganglienzellschicht (GCL) und der inneren Körnerschicht (INL) präsent. Eine schwache Färbung gegen pSmad2 zeigte sich in der inneren plexiformen Schicht (IPL). Im Gegensatz zum WT war das Signal für pSmad2 in allen drei Schichten stark erhöht. GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere nukleäre Schicht, Blau: DAPI, Rot: pSmad2, , Maßstabsbalken: 50 μ m.

Es zeigte sich im Kontrolltier eine positive Färbung gegen pSmad2 im Bereich der GCL, der INL und eine schwache Färbung in der IPL. Dieses Signal erschien bei Betrachtung des TG-Tieres gegenüber dem WT in allen drei Netzhautschichten stark erhöht, was die Annahme untermauert, dass der TGF- β -Signalweg auch im HAA der β B1-Maus vermehrt aktiviert wird.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Expression von Smad7 in der Retinae der TG-Tiere verglichen zum WT signifikant reprimiert wurde ($0,44 \pm 0,21$, $p = 0,05$, $n = 8$) (Abbildung 4-24), was ebenfalls zu einer Erhöhung der TGF- β -Signalantwort beitragen könnte.

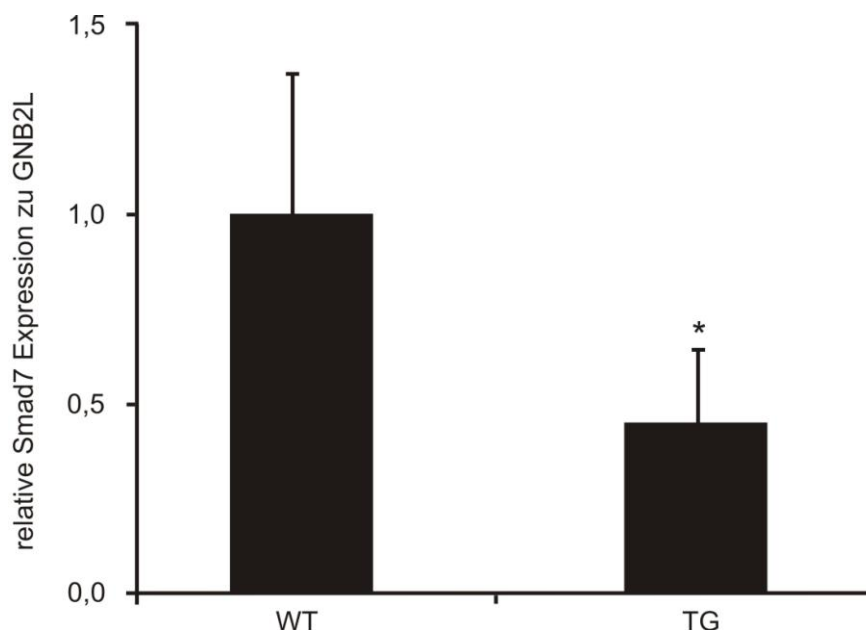


Abbildung 4-24: **Reduktion des mRNA-Levels von Smad7 in Retinae 8 Wochen alter TG-Mäuse.** Die quantitative Real-Time RT PCR ergab einen signifikanten Abfall des inhibitorischen Smad7 Proteins um 56 % ($0,44 \pm 0,21$, $p = 0,05$, $n = 8$) im Vergleich zum 2 Monate alten WT-Tier. Als Referenzgen zur Normierung der mRNA diente GNB2L. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$.

4.2.2 Auswirkung von CTGF und BMP auf das Überleben der RGZ-Zellen

In der β B1-Maus konnte ein permanent erhöhter Augeninnendruck (IOD), der mit einem sukzessiven Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGZ-Zellen) einherging, festgestellt werden (Junglas *et al.*, 2012). Jedoch blieb die Frage offen, ob dieser Effekt indirekt, durch Erhöhung des IODs, oder direkt von CTGF hervorgerufen wird. Zusätzlich sollte die Rolle der BMPs auf das Überleben der RGZ-Zellen untersucht werden, da es aus der Literatur Hinweise darauf gibt, dass diese

Wachstumsfaktoren neuroprotektive Wirkung haben könnten (Ueki *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2004).

4.2.2.1 Gesamtanzahl der Axone durch CTGF und BMP7 nicht verändert

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die Degeneration der RGZ-Zellen und ihrer Axone eine direkte oder eine indirekte Folge der Überexpression von CTGF war. Hierzu wurden 3 µl von rekombinantem CTGF (30 ng/ml) in den Glaskörper von 10-12 Wochen alten CD-1-WT-Mäusen eingebracht. Um zu untersuchen, ob die BMPs ein neuroprotektives Potential gegenüber den RGZ-Zellen besitzen, wurden ebenfalls 30 ng/ml BMP7 intravitreal injiziert. In das kontralaterale Auge wurden jeweils 3 µl der Trägersubstanz PBS als Kontrolle appliziert.

21 Tage nach Applikation in den Glaskörper wurden die *Nervi optici* präpariert und Semi-Dünnschnitte angefertigt. In der lichtmikroskopischen Betrachtung zeigten die Querschnitte der *Nervi optici* der PBS-injizierten Augen das Bild eines gesunden Sehnervens (Abbildung 4-25). Dies bedeutet, dass die Axone gleichförmig und dicht nebeneinander lokalisiert waren, und der Anteil des glialen Gewebes im Sehnerv gering war. Des Weiteren waren die Myelinscheiden der Axone einheitlich gefärbt und intakt (Abbildung 4-25A). Auch in den CTGF, BMP7 und den mit der Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren injizierten Augen zeichnet sich ein nicht modifiziertes Aussehen ab (Abbildung 4-25B-C).

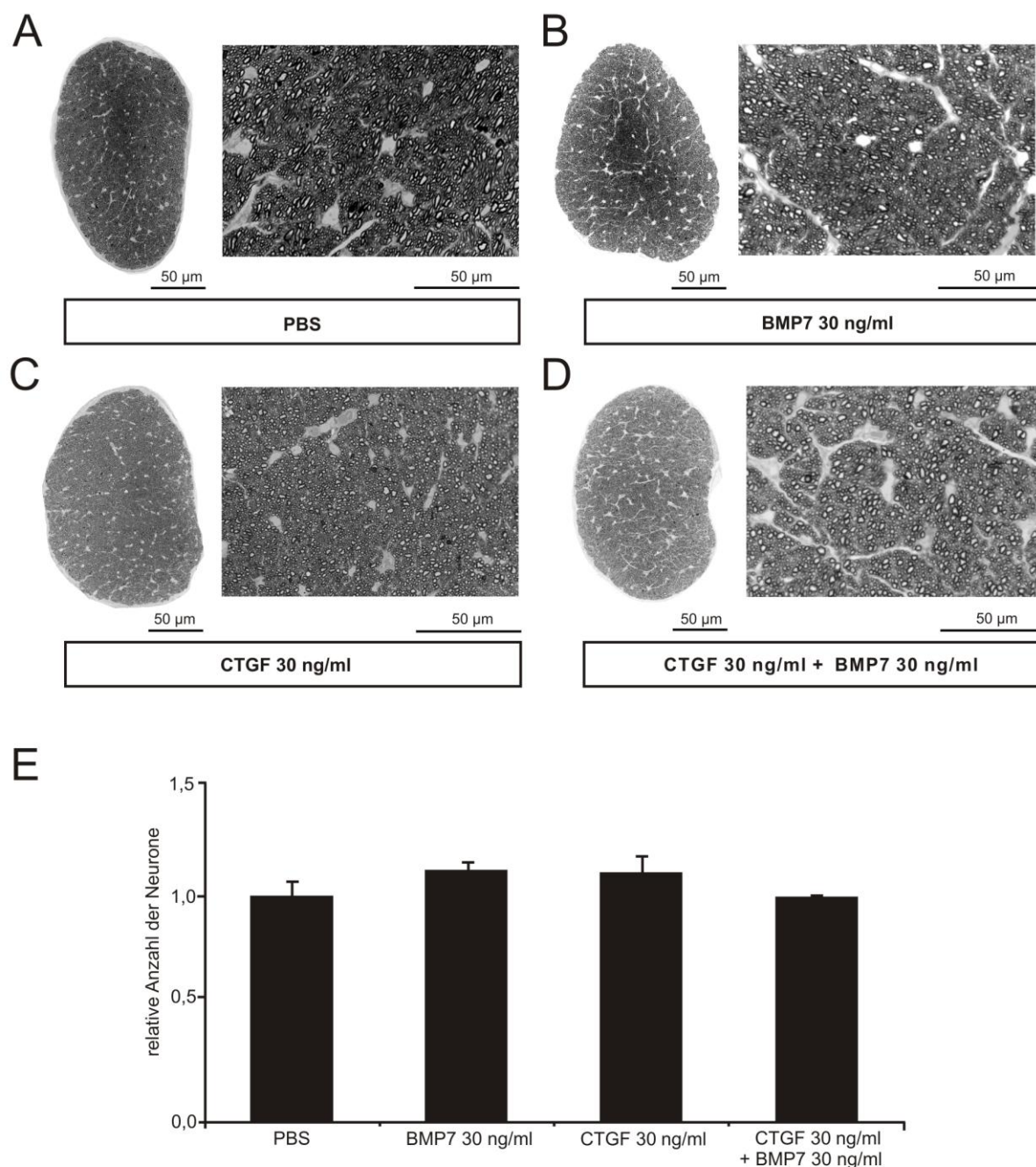


Abbildung 4-25: **Kein Unterschied in der Axonanzahl des Sehnervs PBS- und CTGF-intravitreal-injizierter CD1-WT-Tiere.** Frontale-Semidünnschnitte der *Nervi optici* von CD1-Wildtyp-Tieren 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3 µl PBS (A), CTGF (30 ng/ml) (B), BMP (30 ng/ml) (C) und im Kombination von CTGF und BMP7 (D). Bei der histologischen Betrachtung der Sehnerven zeigten alle Behandlungen ein normales Aussehen. Die Verteilung der Axone und des glialen Gewebes war ohne Auffälligkeiten. Die Kontrastierung der Myelinscheiden war gleichmäßig und sie erschienen als nicht beeinträchtigt. (E) Die Quantifizierung der Gesamtaxonanzahl der Axone bestätigte die morphologische Untersuchung. Die Applikation aller Kombinationen zeigten keine Differenz zur Kontrolle (PBS). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Diese morphologische Analyse konnte durch die Quantifizierung der Gesamtanzahl der Axone abgesichert werden (Abbildung 4-25E). Die Axonzahl der mit den

rekombinanten Proteinen aller Zusammensetzungen in den Glaskörper von CD-1-WT-Mäusen injizierten *Nervi optici* zeigten keine signifikante Abweichungen gegenüber dem Ergebnis für die PBS-Applikation (CTGF: $1,10 \pm 0,07$; BMP7: $1,12 \pm 0,03$; CTGF + BMP7: $1,00 \pm 0,01$). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Verlust der Axone im *Nervus opticus* der CTGF-Überexpressionsmaus alleine dem Anstieg des IODs geschuldet ist.

4.2.2.2 CTGF und BMP7 haben keine signifikanten Effekte auf die Apoptose von RGZ-Zellen

Die Degeneration der Axone im *Nervus opticus* kann als eine Spätfolge des Absterbens der RGZ-Zellen betrachtet werden. Aus diesem Grund sollte zusätzlich der Einfluss von CTGF und der BMPs auf apoptotische Vorgänge in den RGZ-Zellen hin untersucht werden. Hierzu wurde wiederum CTGF alleine oder in Kombination mit BMP7 in den Glaskörper wildtypischer Mäuse injiziert. 24 h nach Applikation in den Glaskörper wurden die Augen enukleiert und apoptotische Prozesse in der Netzhaut mittels TUNEL-Analyse untersucht.

Eine erste Betrachtung zeigte keinen bemerkenswerten Unterschied in der Anzahl TUNEL-positiver Zellkerne zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 4-26).

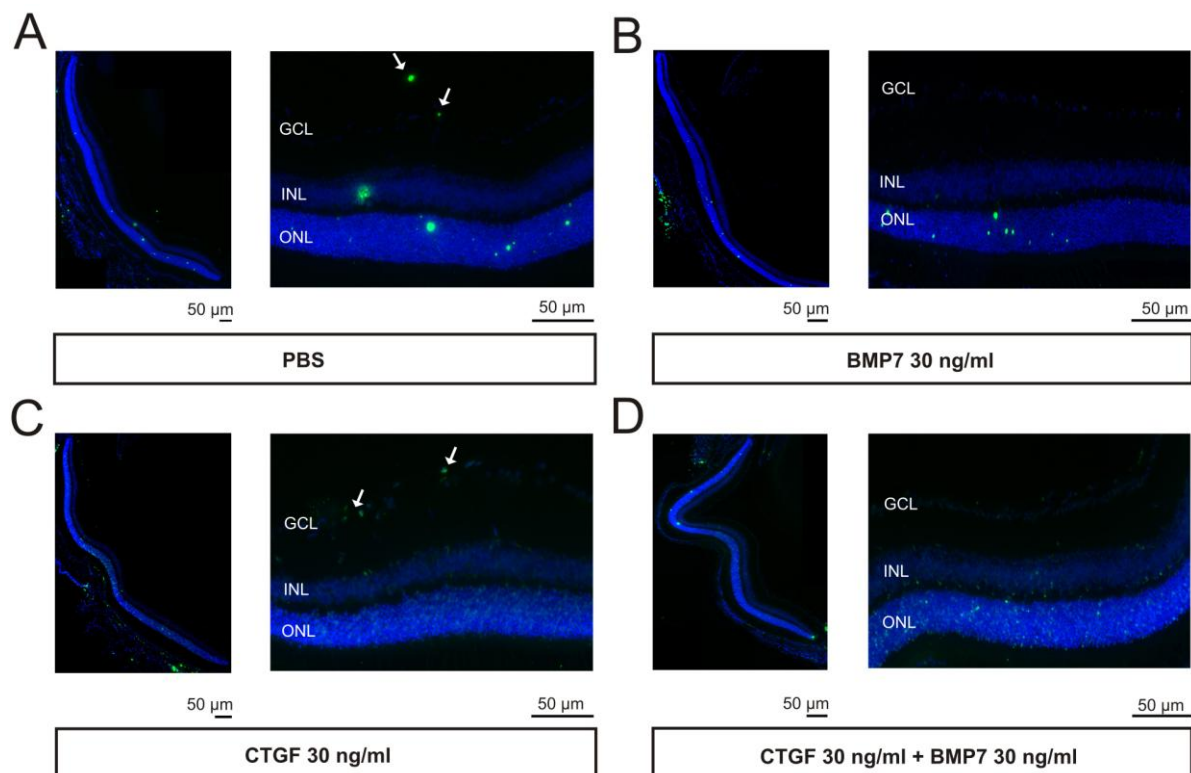


Abbildung 4-26: **Intravitreal-injiziertes CTGF zeigten eine leicht erhöhte Anzahl an TUNEL-positiven RGZ-Zellen in CD-1-WT-Mausaugen.** Markierung TUNEL-positiver RGZ-Zellen sagittaler Paraffinschnitte 24 h nach intravitrealer Injektion mit 3µl PBS (A), BMP7 (30 ng/ml) (B), CTGF (30 ng/ml) (C) und in Kombination von CTGF und BMP (D). Blau: DAPI, Grün: TUNEL-positive RGZ-Zellen, Maßstabsbalken: 50 µm.

Durch die Quantifizierung konnten für die Injektion von PBS durchschnittlich $6 \pm 3,61$ TUNEL-positive RGZ-Zellen identifiziert werden. Die Applikation von BMP7 in den Glaskörper der CD1-WT ergab $2 \pm 0,81$, während die Evaluation für die CTGF-Behandlung einen leichten Anstieg der apoptotischen RGZ-Zellkerne hervorbrachte ($18,7 \pm 3,28$). Diese schwache Erhöhung der TUNEL-markierten Zellen ist allerdings in der Gesamtheit zu vernachlässigen, wenn man bedenkt, dass die murine GCL-Schicht aus rund 50.000 RGZ-Zellen aufgebaut ist. Jedoch gab es bei der Kombinationsbehandlung von CTGF zusammen mit BMP7 einen Hinweis auf einen etwaigen protektiven Effekt der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, da hier ein leichter Rückgang der TUNEL-markierten RGZ-Zellen im Vergleich zu der Injektion mit CTGF alleine beobachtet wurde ($3,25 \pm 1,03$).

4.2.2.3 Reduktion der Zellviabilität durch CTGF unter Stress-Bedingungen, während BMP7 diesen Effekt minimiert

Um dieses Phänomen intensiver zu untersuchen, wurde der Einfluss von CTGF und BMP7 auf die Viabilität von retinalen neuronalen Zellen in einem *in vitro*-Experiment mit 661-W-Zellen geprüft. Hierfür wurden Analysen mit dem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durchgeführt.

Im Experiment wurden ausdifferenzierte und 24 h unter serumfreien Bedingungen inkubierte 661-W-Zellen mit BMP7 (10 ng/ml), CTGF (50 ng/ml) und einer Kombination beider Faktoren für weitere 24 h behandelt. Die serumfreien, also hungernden, Bedingungen simulieren für die Zellen eine Art von Stress. Danach erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay (Abbildung 4-27).

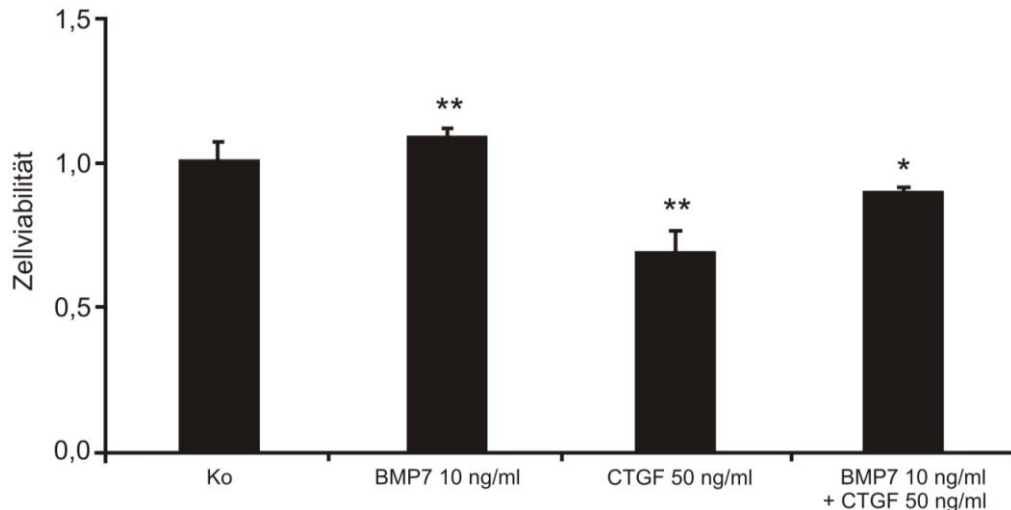


Abbildung 4-27: **CTGF erniedrigt die Zellviabilität der 661-W-Zellen, während dieser Effekt durch BMP7 abgefangen wird.** Die Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen war bei BMP7 ein 10 %-iger Anstieg ($1,1 \pm 0,02$) und bei CTGF ein 31 %-iger Abfall ($0,69 \pm 0,07$) der Überlebensfähigkeit zu erkennen. Der durch CTGF erkennbare negative Effekt auf die Viabilität der RGZ-Zellen wurde durch die Inkubation mit BMP7 minimiert ($0,9 \pm 0,01$). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

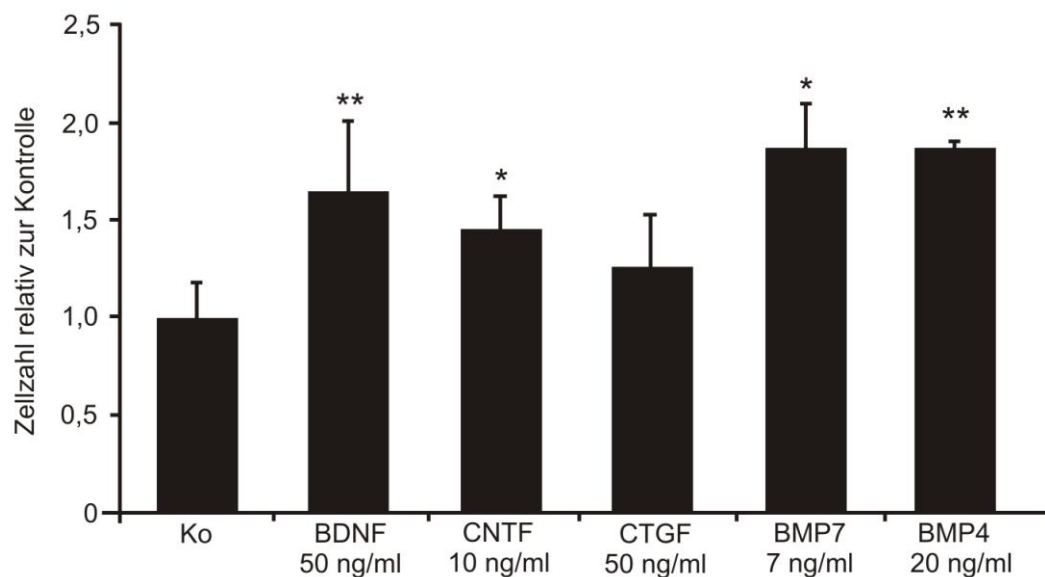
Bei der Evaluation der Überlebensfähigkeit dieser retinalen Zellen zeigte die BMP7-Behandlung unter diesen Stressbedingungen einen positiven Effekt ($1,1 \pm 0,02$). Im Gegensatz dazu wurde die Viabilität der Zellen nach CTGF-Induktion auf $0,69 \pm 0,07$ gesenkt. Die gleichzeitige Behandlung mit BMP7 konnte diesen negativen Effekt von CTGF aufheben ($0,9 \pm 0,01$).

Um diesen Punkt an retinalen Ganglienzellen zu überprüfen, sollten die Ergebnisse für die Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen in Kooperation mit Zhiyong Yang (John-Hopkins Universität, Baltimore, USA) untersucht werden. Diese Zusammenarbeit ermöglichte uns die Untersuchung der Auswirkungen von CTGF, BMP4 und -7 auf die Überlebensfähigkeit primärer muriner RGZ-Zellen.

Die aus dem Mausauge isolierten und danach kultivierten Ganglienzellen wurden im serumfreien Medium für 24 h mit 20 ng/ml BMP4, 7 ng/ml BMP7 und 50 ng/ml CTGF versetzt. Zusätzlich wurden 10 ng/ml des rekombinanten Ciliary Neurotrophic Factors (CNTF) und 50 ng/ml des Brain Derived Neurotrophic Factors (BDNF) eingesetzt. Die als neurotrophe Faktoren bekannten Proteine schützen RGZ-Zellen vor dem Zelltod und kamen deshalb bei diesem Versuch als Referenz zum Abschätzen protektiver Eigenschaften von BMP4 und 7 zum Einsatz. Weiterhin sollte getestet werden, ob CTGF unter serumfreien Bedingungen, in Kombination mit einer Isoform der BMPs, Auswirkungen auf die RGZ-Zellviabilität hat. Um die

Stärke eines etwaigen Effekts des Wachstumsfaktors auf die Ganglienzellen abschätzen zu können, kam zusätzlich der Inhibitor Dorsomorphin zum Einsatz. Dorsomorphin kann selektiv die Signalantwort der BMPs unterbinden und wurde deshalb als Referenz für den Grad des CTGF-Einflusses verwendet (Abbildung 4-28).

Das neuroprotektive Potential von BMP4 und -7 war auch nach Behandlung der primären RGZ-Zellen zu erkennen. Die Inkubation der beiden Wachstumsfaktoren gegenüber der Kontrolle (BMP4: $1,86 \pm 0,04$, $p = 2,0 \times 10^{-07}$, $n = 5$; BMP7: $1,86 \pm 0,23$, $p = 0,013$, $n = 5$) führte für BMP4 zu einer hochsignifikant und für BMP7 zu einer signifikant erhöhten Überlebensrate der RGZ-Zellen. Verglichen mit dem Einfluss von BDNF ($1,64 \pm 0,37$, $p = 0,002$, $n = 5$) und CNTF ($1,45 \pm 0,18$, $p = 0,015$, $n = 5$) waren die Auswirkungen von den BMPs am effektivsten. Für CTGF konnte ebenfalls eine leicht positive Auswirkung auf die Viabilität der RGZ-Zellen erkannt werden ($1,26 \pm 0,27$) (Abbildung 4-28A und B).

A

B

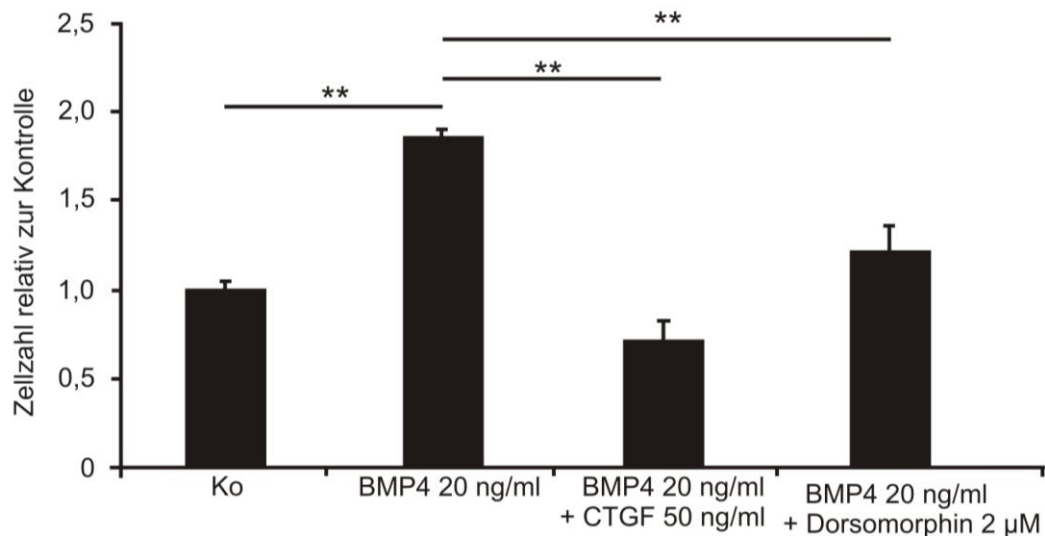


Abbildung 4-28: Die Viabilität von primären murinen RGZ-Zellen konnte durch den Einsatz von BMP4 und -7 gesteigert werden, während CTGF diesen protektiven Effekt verringerte. (A) Nach Behandlung der primären murinen RGZ-Zellen unter serumfreien Bedingungen konnte gezeigt werden, dass BMP7 und BMP4 den stärksten protektiven Effekt auf die Zellen aufwiesen (BMP4: $1,86 \pm 0,04$, $p = 2,0 \times 10^{-07}$, $n = 3$; BMP7: $1,86 \pm 0,23$, $p = 0,013$, $n = 3$). (B) Der Einsatz von CTGF neutralisierte diese durch BMP4 verursachte, erhöhte Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen hochsignifikant ($p = 1,8^{-6}$, $n = 3$). Die Blockierung durch CTGF war dabei effektiver als mit dem selektiven Inhibitor für den BMP-Signalweg (BMP4 + CTGF: $0,72 \pm 0,19$; $p = 1,8^{-6}$, $n = 3$; BMP4 + Dorsomorphin: $1,21 \pm 0,16$, $p = 0,002$, $n = 3$). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Bei der Behandlung von CTGF zusammen mit BMP4 konnte die schützende Wirkung von BMP4 auf die Viabilität der primären RGZ-Zellen hochsignifikant aufgehoben werden ($p = 1,8 \times 10^{-06}$). Die Zellzahl dieser Kombinationsbehandlung aus BMP4 und CTGF belief sich hier um 28 % unter dem Kontrollniveau (Ko: $1,0 \pm 0,04$; BMP4 + CTGF: $0,72 \pm 0,19$). Im Vergleich zur Behandlung aus BMP4 und Dorsomorphin fiel auf, dass CTGF den positiven Einfluss von BMP4 auf die Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen stärker blockieren konnte als der selektive Inhibitor für die BMP-Signalantwort (BMP4 + Dorsomorphin: $1,21 \pm 0,16$, $p = 0,002$, $n = 5$).

4.2.3 Auswirkungen von CTGF und BMP4 bzw. -7 auf das Überleben der RGZ-Zellen im NMDA-Stressmodell

Die im letzten Datenpunkt eruierten Ergebnisse führten zu der Annahme, dass CTGF im glaukomatösen Auge unter Stressbedingungen wie z.B. erhöhter IOD eventuell zu einer Verstärkung der Pathogenese des POWG beitragen könnte.

Deshalb war es interessant dem Aspekt nachzugehen, welche Rolle CTGF im bereits erkrankten Auge einnimmt und ob CTGF im Stressmodel zu ähnlichen Effekten im HAA führen kann. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob BMP7 tatsächlich protektive Eigenschaften gegenüber den RGZ-Zellen *in vivo* hat.

4.2.3.1 BMP7 zeigt einen protektiven Effekt auf die Zellviabilität

Zuerst wurde sich der Klärung dieser Frage *in vitro* über die Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay an 661-W-Zellen angenähert. Hierzu wurden die 24 h unter serumfreien Bedingungen inkubierten 661-W-Zellen weitere 24 h mit NMDA (5 mM), NMDA + BMP7 (10 ng/ml) und NMDA + CTGF (50 ng/ml) versetzt.

Das Glutamatagon NMDA bindet an die tetrameren NMDA-Rezeptoren der RGZ-Zellen, führt zu einer Hyperaktivierung der Rezeptoren und damit zu einem massiven Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Die Bildung freier Radikale initiiert proteolytische Prozesse, welche die Apoptose einleiten. Dieser so induzierte Untergang von RGZ-Zellen wird als exzitotoxische Schädigung bezeichnet. (Lipton 2006) und ist in unserem Labor ein etabliertes Schadensmodel. Anschließend an die Behandlung wurden die Einflüsse von CTGF und BMP7 auf die Überlebensfähigkeit der 661-W-Zellen mittels MTT-Assay hin analysiert (Abbildung 4-29).

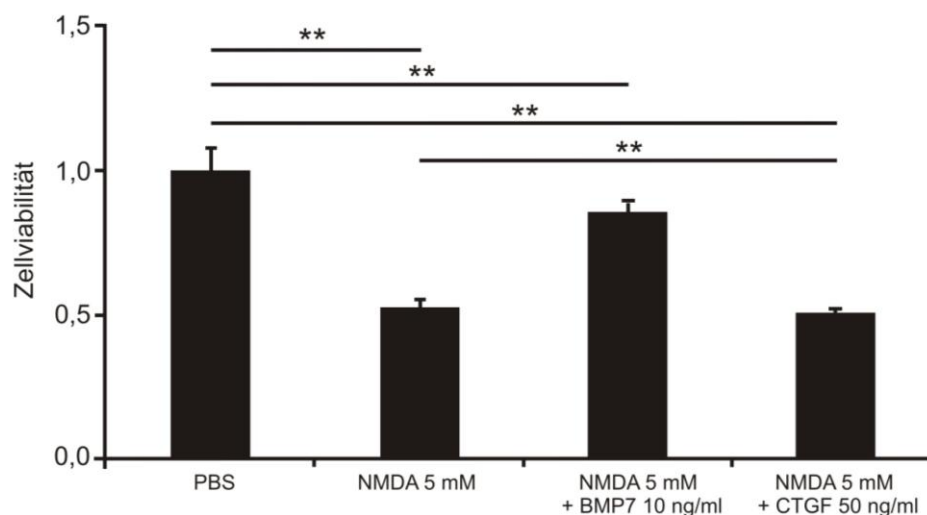


Abbildung 4-29: **BMP7 wirkte sich nach einem NMDA-induzierten Schaden protektiv auf die Überlebensfähigkeit von 661-W-Zellen aus.** Die Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Die Zellviabilität der zuvor ausdifferenzierten und 24 h unter serumfreien Bedingungen gehaltene 661-W-Zellen wurde durch die Behandlung mit NMDA (5m) herabgesetzt ($0,49 \pm 0,01$, $p = 7,96 \times 10^{-20}$, $n = 48$). Die Kombination aus NMDA + CTGF hatte keine weiteren Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit der Zellen ($0,5 \pm 0,03$, $p = 3,80 \times 10^{-22}$, $n = 48$), während die Inkubation von BMP7 zusammen mit NMDA in

einer verbesserten Viabilität der 661-W-Zellen mündete ($0,85 \pm 0,01$). Alle hier dargestellten Resultate waren im Vergleich zur Kontrolle statistisch hochsignifikant. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Die NMDA-vermittelte exzitotoxische Schädigung erwirkte eine hochsignifikante Reduktion der Zellviabilität um 51 % ($0,49 \pm 0,01$, $p = 7,96 \times 10^{-20}$, $n = 48$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, wobei die Kombination mit BMP7 zu einer Reduktion des NMDA-Effektes führte und dadurch die Viabilität der Zellen wieder um 35 % zunahm ($0,85 \pm 0,01$, $p = 1,00 \times 10^{-12}$, $n = 27$). Dieses Ergebnis war ebenfalls hochsignifikant. Die Evaluation der Kombinationsbehandlung aus NMDA + CTGF gibt keinen Hinweis auf eine weitere Beeinflussung der RGZ-Zell-Überlebensfähigkeit durch den Wachstumsfaktor ($0,5 \pm 0,03$, $p = 3,80 \times 10^{-22}$, $n = 48$).

4.2.3.2 CTGF hat einen negativen und BMP4/7 einen positiven Einfluss auf die Zellviabilität der RGZ im NMDA–Stressmodell

Um die *in vitro* beobachteten protektiven Eigenschaften von BMP7 gegenüber den 661-W-Zellen intensiver zu analysieren, wurden dessen Auswirkungen zusätzlich *in vivo* untersucht. Zusätzlich sollten die unterschiedlichen Beobachtungen der MTT-Assays für die Auswirkungen von CTGF auf die Überlebensfähigkeit der Ganglienzellen verifiziert werden.

Hierzu wurden intravitreale Injektionen an 10-12 Wochen alten CD1-WT-Mäusen durchgeführt. Appliziert wurde hier je 3 μ l NMDA (10 mM) alleine, in Kombination mit CTGF (30 ng/ml), BMP7 (30 ng/ml) oder NMDA zusammen mit beiden rekombinanten Proteinen. Als Referenzwerte dienten die nach NMDA-Applikation quantifizierten Sehnerven. Auch hier erfolgte die Präparation nach 21 Tagen. Anschließend wurden die *Nervi optici* in Epon eingebettet, Semi-Dünnschnitte hergestellt und für die Analyse kontrastiert. Nach Applikation von NMDA fand sich hier ein stark verändertes morphologisches Bild gegenüber den unter Punkt 4.2.1 PBS-, CTGF- und BMP7-injizierten Augen. Nach Einbringen von NMDA in den HAA zeigten die *Nervi optici* ausgedehnte Bereiche glialer Narbenfelder. Weitere Auffälligkeiten waren ein deutlicher Verlust an Axonen und eine Vielzahl an intensiv gefärbten Nervenfasern, was auf die Degeneration der Myelinscheiden nach dem Zelltod der RGZ-Zellen hindeutete (Abbildung 4-30A). BMP7 schien diesem durch NMDA-induzierten Schaden entgegenzuwirken (Abbildung 4-30B). Der Verlust der Axone war hier im Vergleich mit der NMDA-Behandlung signifikant reduziert und die

glialen Narbenfelder waren weniger stark ausgeprägt. Auch die Dunkelfärbung der axonalen Markscheiden war minimiert. Außerdem konnte bereits bei der lichtmikroskopischen Betrachtung festgestellt werden, dass die *Nervi optici* der NMDA + CTGF injizierten Augen, im Vergleich der mit NMDA alleinig behandelten Augen, zu einem noch massiveren Schadensbild führte (Abbildung 4-30C). Wohingegen der Einsatz von BMP7 in Kombination mit NMDA und CTGF anscheinend wiederum zu einer Verringerung des durch CTGF und NMDA verursachten axonalen Verlustes beitrug (Abbildung 4-30D).

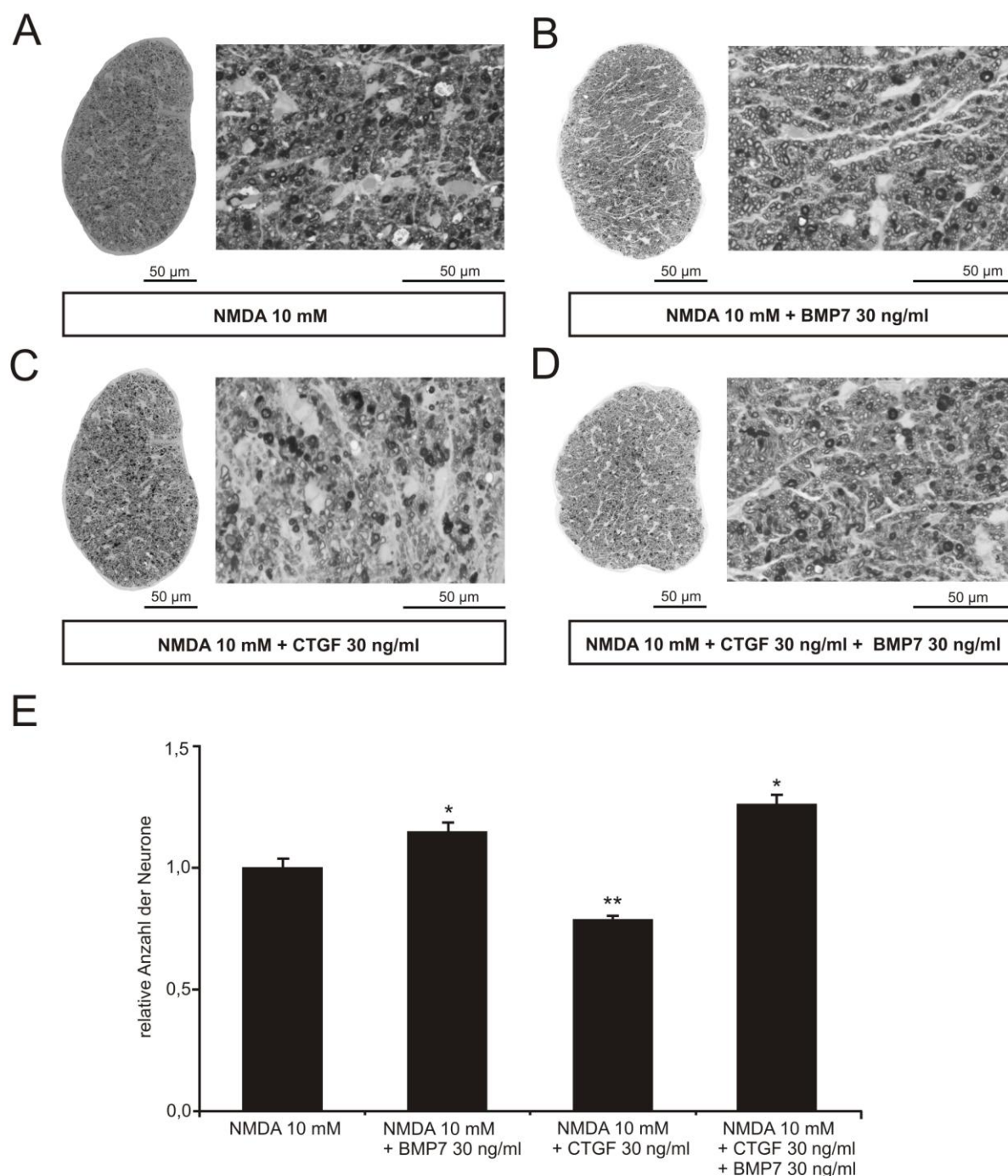


Abbildung 4-30: Im Schadensmodell führte CTGF, 21 Tage nach intravitrealer Injektion in Kombination mit NMDA, zu einem erhöhten Verlust an RGZ-Zellen, während BMP7 dem Niedergang entgegenwirkt. (A)-(D) Frontale-Semidünnschnitte der *Nervi optici* von CD1-WT-Tieren 21 Tage nach intravitrealer Injektion von 3 μ l NMDA (10 mM), NMDA + BMP7 (30 ng/ml), NMDA + CTGF (30 ng/ml), und NMDA in Kombination mit CTGF + BMP7. Durch die NMDA-Behandlung (10mM) konnte ein morphologisch ausgeprägtes Schadensbild im *Nervus opticus* induziert werden. (A). Die lichtmikroskopische Betrachtung ergab, dass der durch NMDA erzeugte Schaden anscheinend durch BMP7 gerettet und durch CTGF verstärkt wurde (B und C). Die Kombinationsbehandlung von NMDA + BMP7 und CTGF zeigte im Gegensatz zur NMDA + CTGF-Injektion einen abgemilderten Phänotyp. Maßstabsbalken: 50 μ m. (E) Durch die Quantifizierung der Gesamtaxonanzahl der Sehnerven konnte die morphologische Analyse unterstützt werden. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Zur Quantifizierung des Schadens wurde die Gesamtanzahl an Axonen in den Versuchsgruppen ermittelt. In den Sehnerven der NMDA + BMP7-injizierten Augen ergab sich gegenüber der NMDA-Applikation eine hochsignifikante Minimierung des Schadens um 15 % ($1,15 \pm 0,03$, $p = 0,01$, $n = 3$). CTGF erzeugt in Kombination mit NMDA einen ebenfalls um 28 % hochsignifikant gesteigerten Verlust der Axone ($0,78 \pm 0,01$, $p = 0,01$, $n = 3$). Dieser durch CTGF erhöhte Schaden konnte, wie auch der durch NMDA vermittelte Niedergang der RGZ-Zellen, in der Injektion von NMDA + CTGF + BMP7 durch BMP7 gerettet werden. Es wurde sogar im Vergleich mit alleiniger NMDA-Applikation ein Anstieg der Axonzahl um 26 % registriert ($1,26 \pm 0,04$).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass CTGF in Kombination mit NMDA, zu einem gesteigerten Schaden beitrug, was die Annahme des MTT-Assays bei exzitotoxischem Schaden widerlegte (vgl. Punkt 4.2.2.). Die Protektion der RGZ-Zellen, wurde wie bei den Ergebnissen aus den Zellviabilitätsassay, durch BMP7 garantiert.

4.2.3.3 BMP7 vermindert eine NMDA-induzierte Apoptose der RGZ-Zellen, wohingegen CTGF zum vermehrten Zelltod beiträgt

Zur weiteren Analyse und Verifizierung der Auswirkungen von CTGF und BMP7 auf den Untergang der RGZ-Zellen fand der TUNEL-Assay ein weiteres Mal Anwendung (Abbildung 4-31). Bevor jedoch die Markierung der apoptotischen RGZ-Zellen erfolgte, wurden 10-12 Wochen alte CD1-WT-Mäuse mit je 3 μ l NMDA (10 mM) alleine, in Kombination mit BMP7 (30 ng/ml), CTGF (30 ng/ml) oder zusammen mit CTGF und BMP7 in den Glaskörper injiziert. 24 h nach Behandlung wurden die Augen enukleiert, in Paraffin eingebettet und sagittale Gewebeschnitte angefertigt.

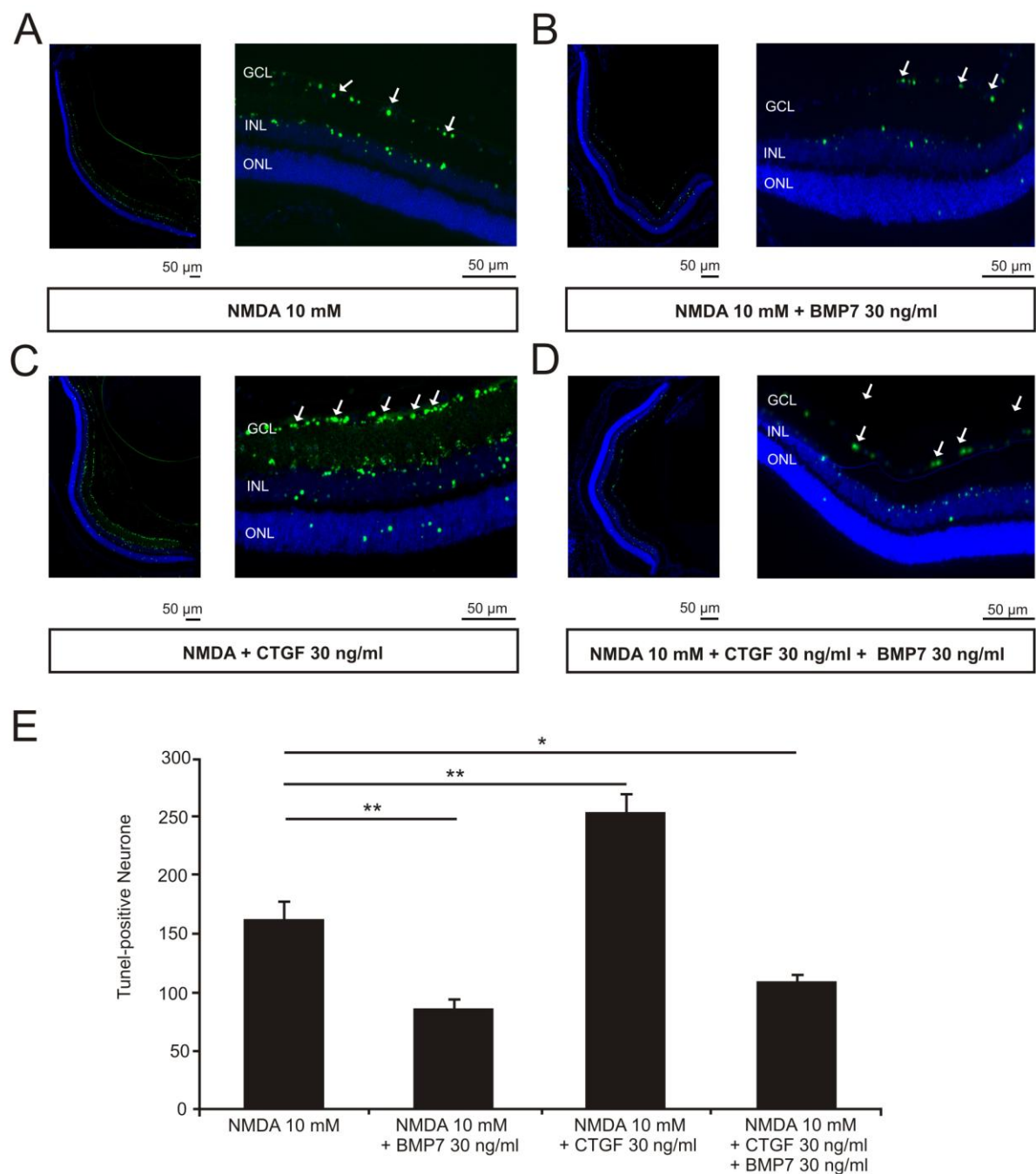


Abbildung 4-31: CTGF und Stress induzierten und BMP7 reduzierte die Apoptose von RGZ-Zellen nach intravitrealer Injektion von CD1-WT-Mausaugen. Markierung TUNEL-positiver RGZ-Zellen von sagittalen Paraffinschnitten 24 h nach intravitrealer Injektion mit 3 µl NMDA (10 mM) (A), NMDA + BMP7 (30 ng/ml) (B), NMDA + CTGF (30 ng/ml) (C) und NMDA in Kombination mit CTGF und BMP (D). Blau: DAPI, Grün: TUNEL-positive RGZ-Zellen, Maßstabsbalken: 50 µm. (E) Die NMDA-Applikation ergab $162,25 \pm 15,37$ TUNEL-positive Zellkerne in der RGZ-Zellschicht. Diese Zahl wurde durch den Einsatz von BMP7 mit NMDA hochsignifikant auf $86 \pm 7,48$ ($p = 0,004$, $n = 3$) absterbende Zelle minimiert und durch NMDA im Kombination mit CTGF hochsignifikant erhöht. (254 ± 16 ($p = 4,83 \times 10^{-05}$, $n = 3$)). In der Behandlung von NMDA + CTGF + BMP7 wurden die RGZ-Zellen signifikant durch BMP7 vor dem Zelltod bewahrt ($109,33 \pm 6,43$, $p = 0,04$, $n = 3$). Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Nach NMDA-Injektion zeigten sich in der Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop $162,25 \pm 15,37$ in Apoptose befindliche Zellen in der RGZ-Schicht (Abbildung 4-31A und E). Die Menge an TUNEL-positiven Zellen verringerte sich signifikant durch gleichzeitige Applikation von BMP7 auf $86 \pm 7,48$ ($p = 0,004$, $n = 3$) (Abbildung 4-31B und E). Im Vergleich der Subgruppen zwischen alleiniger NMDA- und kombinierter NMDA + CTGF-Applikation konnte ein hochsignifikanter Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellkerne auf 254 ± 16 ($p = 4,83 \times 10^{-05}$, $n = 3$) durch CTGF verzeichnet werden (Abbildung 4-31C und E). Die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen der NMDA + CTGF + BMP7 intravitreal injizierten Augen war signifikant und entsprach in etwa denen der NMDA + BMP7-Injektion $109,33 \pm 6,43$ ($p = 0,04$, $n = 3$) (Abbildung 4-31D und E). In allen vier Behandlungen konnten zusätzlich zur RGZ-Zellschicht apoptotische Zellen im Bereich der INL und für die NMDA + CTGF-Applikation vereinzelt auch in der ONL-Schicht beobachtet werden.

Hierdurch wurde nochmals bestätigt, dass CTGF im Stressmodell direkt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen einwirken konnte. Der Wachstumsfaktor erniedrigt die Viabilität signifikant. Im Gegensatz dazu konnte die reduzierte Viabilität der RGZ-Zellen nach CTGF Behandlung durch protektive Eigenschaften von BMP7 revertiert werden.

4.2.3.4 Die Empfindlichkeit der RGZ-Zellen auf Umwelteinflüsse wird durch CTGF erhöht

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, wie CTGF die Zellviabilität der RGZ-Zellen vermindert. Eine Möglichkeit dabei war, dass der Wachstumsfaktor die Überlebensfähigkeit der Ganglienzellen durch die Hemmung des BMP-Signalwegs beeinflussen könnte, wodurch der protektive Effekt der BMPs unterbunden würde.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden 10-12 Wochen alte CD-1-WT-Mäuse intravitreal mit je 3 μ l PBS, CTGF (30 ng/ml), NMDA (10 mM) und in Kombination von NMDA + CTGF injiziert. 24 h nach Applikation wurden die Augen analysiert. Für die Visualisierung der BMP-Antwort wurden die Gewebeschnitte mit einem spezifischen Antikörper gegen pSmad1/5/8 immunhistologisch gefärbt. Um die Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen beurteilen zu können, wurden die apoptotischen RGZ-Zellkerne zusätzlich mit Hilfe des TUNEL-Assays gekennzeichnet (Abbildung 4-32).

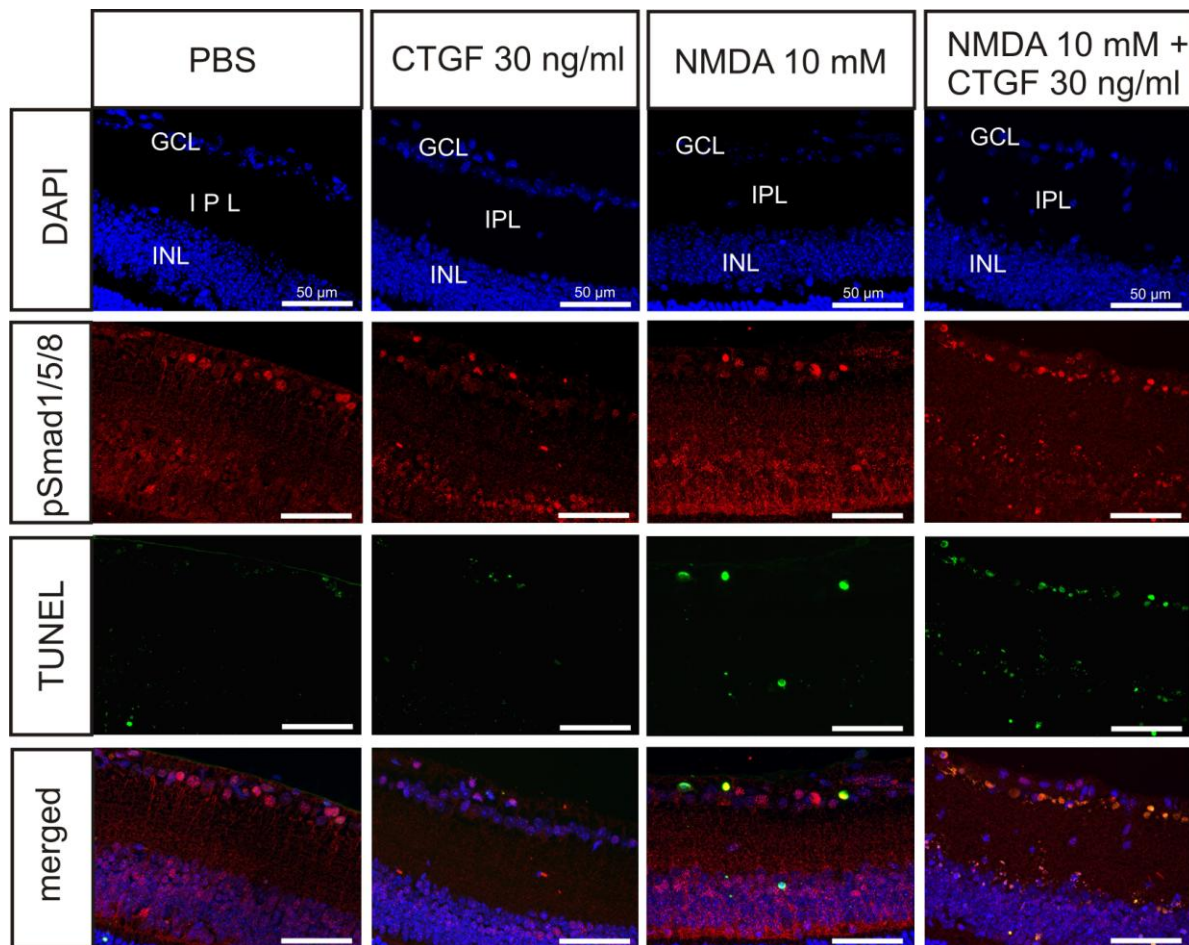


Abbildung 4-32: Die RGZ-Zellen wurden im Stressmodell durch CTGF-vermittelte Inhibition des BMP-Signalwegs verletzlicher für Außeneinflüsse. Durch die immunhistochemische Färbung gegen pSmad1/5/8 und die zusätzliche Markierung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay wurde festgestellt, dass NMDA 24 h nach intravitrealer Injektion zur einer Minimierung des pSmad1/5/8-Signals in den RGZ-Zellen verglichen mit PBS-applizierten Augen führte. In diesen Zellen konnten zusätzlich apoptotische Prozesse registriert werden. Durch CTGF wurde dieser bei NMDA beobachtete Effekt dramatisiert. Auffällig war, dass die alleinige CTGF-Applikation gegenüber der Kontrolle bereits einen weniger aktiven BMP-Signalweg aufwies. Blau: DAPI, Rot: pSmad 1/5/8, Grün: TUNEL-positive Zellen, Maßstabsbalken: 50 μ m.

In den PBS-injizierten Augen konnte ein aktiver BMP-Signalweg in der RGZ-Zellschicht und der INL-Schicht nachgewiesen werden. Eine intravitreale Injektion von CTGF führte zu einer negativen Regulation des pSmad1/5/8-Signals. Dies führte jedoch nicht zu einer erhöhten Anzahl an TUNEL-positiven RGZ-Zellen verglichen zur PBS-Applikation. NMDA bewirkte ebenfalls eine Reduktion der BMP-Antwort in RGZ-Zellen, jedoch war die Inhibition der BMP-Signalisierung nicht in dem Maße beeinflusst wie durch CTGF. Weiterhin war auffällig, dass diese Hemmung des pSmad1/5/8-Signals mit apoptotischen Prozessen einherging. Das gleiche Bild fand sich auch für die Augen, in die NMDA + CTGF eingebracht wurde.

Es fiel auf, dass pSmad1/5/8 im Zellkern nicht mehr gleichmäßig verteilt war. Die Signalmoleküle schienen kondensiert, was vielleicht mit den proteolytischen Abbauprozessen einer apoptotischen Zelle vereinbar sein könnte, da diese Zellen zugleich TUNEL-positiv waren.

Als nächstes wurde die Wirkung von CTGF auf die Expression von BMP7 mittels quantitativer Real-Time RT PCR analysiert. Basis hierfür waren wiederum Glaskörper-Injektionen von 3 µl PBS, CTGF, NMDA und CTGF in Kombination mit NMDA, 6 h nach Applikation der Substanzen wurden die Retinae präpariert und die Gesamt-RNA isoliert (Abbildung 4-33).

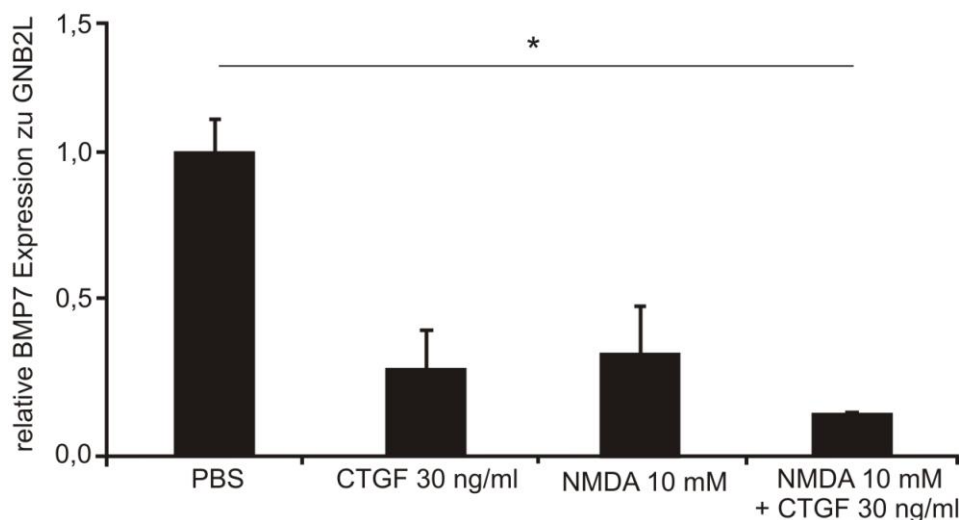


Abbildung 4-33: **Die Expression von BMP7 wurde durch CTGF im NMDA-Stressmodell signifikant reduziert.** Analyse der BMP7 Expression nach intravitrealer Injektion von PBS, CTGF (30 ng/ml), NMDA (10 mM) und in Kombination von NMDA + CTGF. Die Expression von BMP7 war durch NMDA im Vergleich zur Kontrolle auf $0,65 \pm 0,32$ und durch CTGF hochsignifikant auf $0,46 \pm 0,56$ ($p = 0,07$, $n = 5$) herabgesetzt. Im NMDA-Schadensmodell verminderte CTGF die BMP7 Expression signifikant auf $0,02 \pm 0,42$ ($p = 0,04$, $n = 5$). Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Sowohl NMDA als auch CTGF hatten einen negativen Einfluss auf die Expression von BMP7. In Kombination erfuhr der mRNA-Gehalt noch einen weiteren Rückgang. Für die alleinige Gabe von NMDA wurde die BMP7-Expression um 45 % ($0,65 \pm 0,32$) reduziert. Die Injektion von CTGF im gesunden Auge verringerte diese auf 54 % ($0,46 \pm 0,56$) und im NMDA-Schadensmodell ließ sich sogar eine signifikante Reduktion um 98 % ($0,02 \pm 0,42$, $p = 0,04$, $n = 5$) beobachten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CTGF die protektiven Eigenschaften von BMP7 auf die RGZ-Zellen blockieren kann, wodurch diese empfindlicher gegenüber

äußeren Einflüssen wie beispielsweise Stress werden und schneller geschädigt werden können.

4.2.4 Auswirkungen von CTGF auf die Expression neurotropher Faktoren

Es stellte sich nun die Frage, wie neurotrophe Faktoren, die für das Überleben der RGZ-Zellen wichtig sind, unter Einfluss von CTGF modifiziert werden. Ein Grund hierfür ist die Hypothese, dass eine Blockade des axonalen Transports im POWG zu einem verringerten Gehalt und zu einem Defizit dieser Faktoren beiträgt, was letztlich im Zelltod von RGZ-Zellen münden könnte (Kim *et al.*, 2004; Salinas-Navarro *et al.*, 2009, 2010).

4.2.4.1 PEDGF-, LEDGF- und GDNF-Expression wird *in vitro* durch CTGF vermindert

Zuerst wurde der Einfluss von CTGF auf die Expression verschiedener neurotropher Faktoren *in vitro* untersucht. Hierzu wurden ausdifferenzierte 661-W-Zellen nach einer serumfreien Phase für 24 h mit 50 ng/ml CTGF behandelt. Weiterhin versetzte man die Zellen mit 5 mM NMDA alleine und in Kombination mit CTGF um eine exzitotoxische Schädigung der Zellen zu erreichen. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Expression des Pigment Epithelium Derived Factors (PEDF), Lens Derived Growth Factors (LEDGF), und Glial Cell line-derived Neurotrophic Factors (GDNF) mittels quantitativer Real-Time RT PCR hin analysiert (Abbildung 4-34).

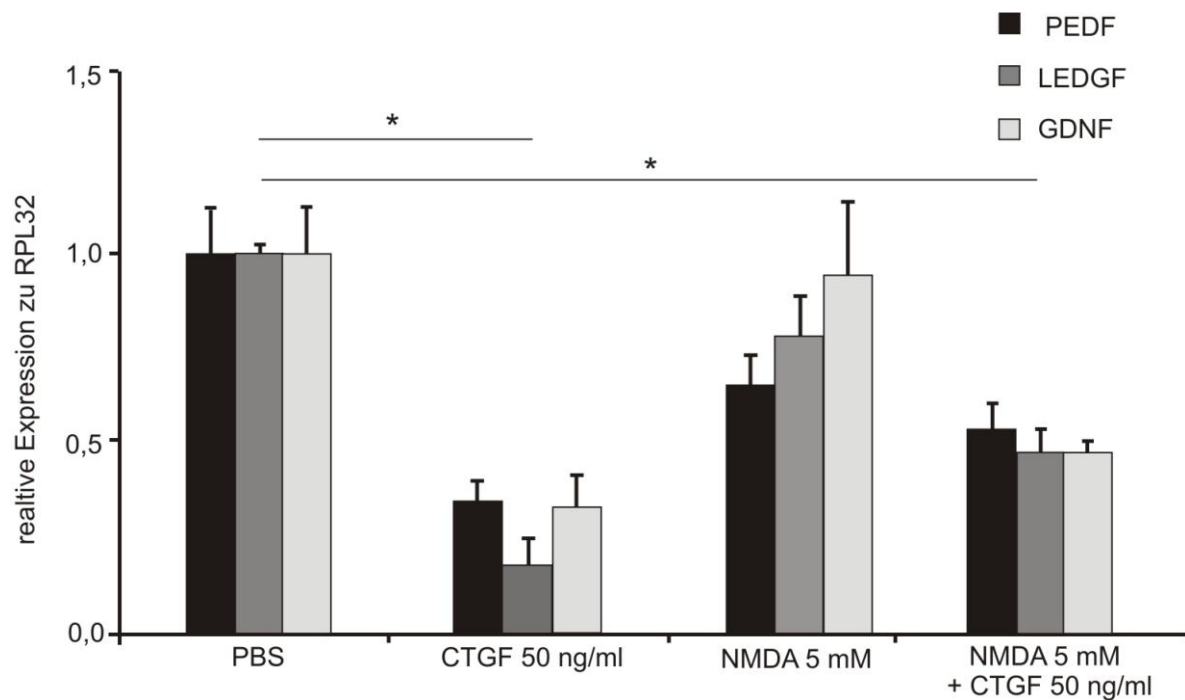


Abbildung 4-34: Die mRNA-Expression von PEDF, LEDGF und GDNF war 24 h nach Behandlung von 661-W-Zellen durch CTGF in Kombination mit Stress gehemmt. Mittels quantitativer Real-Time RT-PCR konnte eine durch CTGF-initiierte massive Abnahme der mRNA-Expression von PEDF, LEDGF und GDNF 24 h nach Behandlung von ausdifferenzierten und unter minimalen Bedingungen gehaltenen 661-W-Zellen beobachtet werden (PEDF: $0,35 \pm 0,22$, $p = 0,03$, $n = 4$; LEDGF: $0,18 \pm 0,20$; GDNF: $0,33 \pm 0,26$). Auch die Behandlung mit NMDA demonstrierte einen Rückgang des mRNA-Gehalts aller drei neurotrophen Faktoren. Dieser Effekt wurde durch die Kombination mit CTGF wiederum verstärkt. Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Die Inkubation der Zellen mit CTGF führte zu einer massiven Abnahme der mRNA aller drei untersuchten neurotrophen Faktoren. PEDF wurde um 65 % ($0,35 \pm 0,22$, $p = 0,03$, $n = 4$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen reduziert. Für LEDGF konnte ein Abfall der Expression um 82 % ($0,18 \pm 0,20$, $p = 0,04$, $n = 4$) und für GDNF von 67 % ($0,33 \pm 0,26$, $p = 0,05$, $n = 4$) erkannt werden. Diese Ergebnisse waren alle statistisch signifikant.

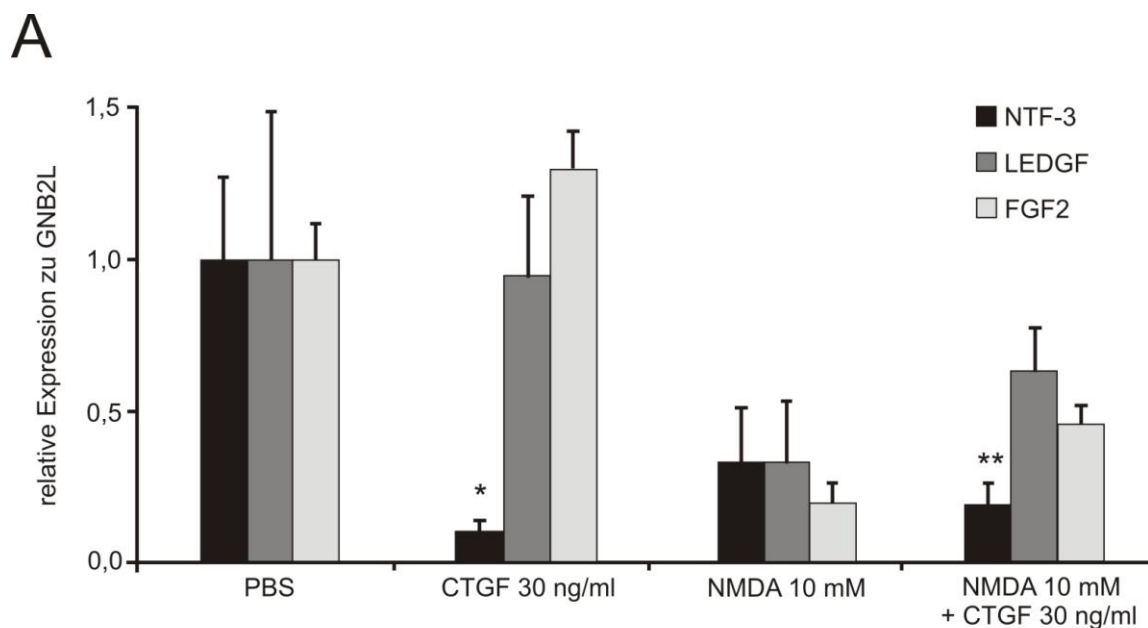
Die Minimierung durch die NMDA-Inkubation war geringer als bei Behandlung mit CTGF allein. PEDF und GDNF erfuhren gegenüber der Kontrolle eine Abnahme von 23 % ($0,77 \pm 0,25$) bzw. 20 % ($0,80 \pm 0,43$). Am wenigsten konnte NMDA die Expression von LEDGF beeinflussen ($0,95 \pm 0,15$)

Die Zugabe von NMDA und CTGF bewirkte ebenfalls einen signifikanten Abfall der mRNA-Menge, jedoch war der Effekt geringer ausgeprägt als bei alleiniger CTGF-Behandlung. Der neurotrophe Faktor PEDF wurde hier gegenüber den Kontrollzellen um 46 % ($0,54 \pm 0,23$, $p = 0,04$, $n = 4$), LEDGF um 52 % ($0,48 \pm 0,27$,

$p = 0,05$, $n = 4$) und GDNF ebenfalls um 52 % ($0,48 \pm 0,18$, $p = 0,04$, $n = 4$) herabgesetzt.

4.2.4.2 CTGF inhibiert den mRNA-Gehalt von NTF-3 *in vivo*

Nach Feststellung einer Repression der neurotrophen Faktoren PEDF, LEDGF und GDNF nach Behandlung von 661-W-Zellen mit CTGF im Stressmodel, sollte nun die Wirkung von CTGF auf die Expression neurotropher Faktoren *in vivo* überprüft werden. Hierzu wurden 3 μ l PBS, CTGF (30 ng/ml), NMDA (10 mM) und NMDA + CTGF in den Glaskörper 10-12 alter CD1-WT-Tiere injiziert. 6 h nach der Applikation wurde die retinale RNA isoliert und hier repräsentativ für neurotrophe Faktoren auf die Expression von Neurotrophin-3 (NTF-3), LEDGF und den Fibroblast-Growth-Factor2 (FGF2) hin getestet (Abbildung 4-35A). Der Grund hierfür war, dass die mRNA-Menge von GDNF und PEDGF in der Retina im Detektions-Grenzbereich und deshalb mittels quantitativer Real-Time RT-PCR schwierig nachzuweisen war.



B

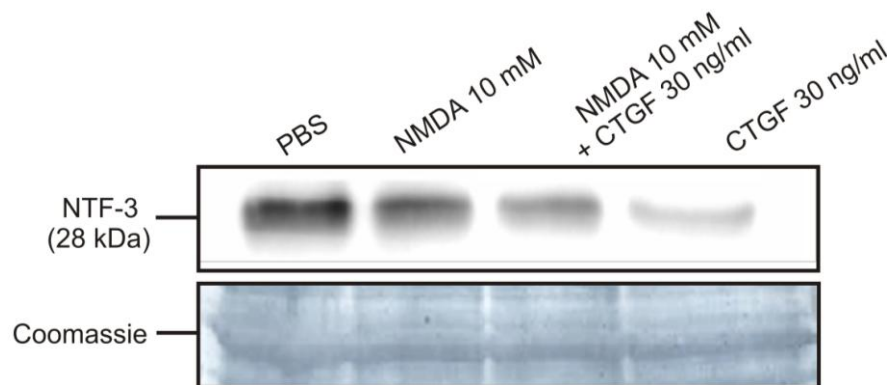


Abbildung 4-35: **Der Gehalt an NTF-3, LEDGF und FGF2 nach intravitrealer Injektion von CD1-WT war als nicht einheitlich zu bewerten.** (A) Bei der mRNA-Analyse von Retinae 6 h nach intravitrealer Injektion von CTGF (30 ng/ml) alleine erbrachte nur NTF-3 eine signifikante Abnahme ($0,11 \pm 0,02$, $p = 0,02$, $n = 5$). LEDGF und FGF2 waren durch CTGF nicht wesentlich beeinflusst. Die Applikation von NMDA führte jedoch zu einer Erniedrigung aller drei neurotrophen Faktoren (NTF-3: $0,33 \pm 0,17$; LEDGF: $0,33 \pm 0,08$, FGF2: $0,19 \pm 0,26$), die wiederum nur für NTF-3 durch die kombinierte Injektion von NMDA + CTGF hochsignifikant intensiviert werden konnte ($0,19 \pm 0,08$, $p = 0,004$, $n = 5$). Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. (B) Die Western Blot Analyse zur Überprüfung des NTF-3 Proteingehaltes von Retinae 2 Monate alter Tiere bestätigte die Untersuchungen für die mRNA-Analyse. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Für den mRNA-Gehalt von NTF-3 wurde nach allen Behandlungen im Vergleich zu den PBS-injizierten Augen eine Reduktion beobachtet. CTGF alleine bewirkte die höchste Verringerung um 89 % ($0,11 \pm 0,02$, $p = 0,02$, $n = 5$). NMDA + CTGF initiierte eine hochsignifikante Abnahme von NTF-3 um 81 % ($0,19 \pm 0,08$, $p = 0,04$, $n = 5$), während NMDA die Expression des neurotrophen Faktors wiederum um 14 % ($0,33 \pm 0,17$) steigern konnte. Dieses Resultat konnte auch nach 6-stündiger intravitrealer Injektion der entsprechenden Proben auf Proteinebene durch die Western Blot Analyse verifiziert werden (Abbildung 4-35B).

Die Expression von LEDGF blieb durch die Injektion von CTGF nahezu unverändert ($0,95 \pm 0,14$). Das NMDA-Schadensmodell führte zu einer 67 %-igen ($0,33 \pm 0,08$) Abnahme der mRNA von LEDGF gegenüber der Kontrolle (PBS). Hier ließ sich auch gleichzeitig der größte Effekt auf den neurotrophen Faktor vermerken, denn durch die Behandlung mit NMDA + CTGF wurde nur ein Rückgang um 35 % beobachtet ($0,65 \pm 0,07$),

Die Daten über die Expression von FGF2 waren sehr variabel. Die Injektion von CTGF alleine implizierte eine Induktion des mRNA-Gehaltes von FGF2 um 30 % ($1,30 \pm 0,34$). Betrachtete man die Auswirkung von NMDA, verringerte sich dieser

um 81 % ($0,19 \pm 0,26$). Die Kombinationsbehandlung von NMDA + CTGF verminderte die Genexpression von FGF2 um 54 % ($0,46 \pm 0,19$) und schwächte damit den durch NMDA initiierten Effekt ab.

4.2.4.3 Inhibition von BDNF, CNTF und NTF-3 im β B1-Mausmodell

Zuletzt sollte die Situation der neurotrophen Faktoren in der Netzhaut von 8 Wochen alten CTGF-Überexpressionsmäusen betrachtet werden. Dabei wurden die beiden Retinae eines Tieres gepoolt und die Gesamt-RNA bzw. -Proteine isoliert. Nachfolgend wurde die Expression von FGF2, NTF-3, BDNF und CNTF kontrolliert (Abbildung 4-36). FGF2 und NTF-3 wurden gewählt, um die Resultate des vorhergehenden Punktes (Punkt 4.2.4.2) zu überprüfen. Nachdem BDNF und CNTF bereits bei der Analyse der primären RGZ-Zellen zum Einsatz kamen, und ein positiver Effekt auf die neuronalen Zellen bestätigt wurde, sollten auch die Auswirkungen von CTGF auf diese Faktoren hin getestet werden.

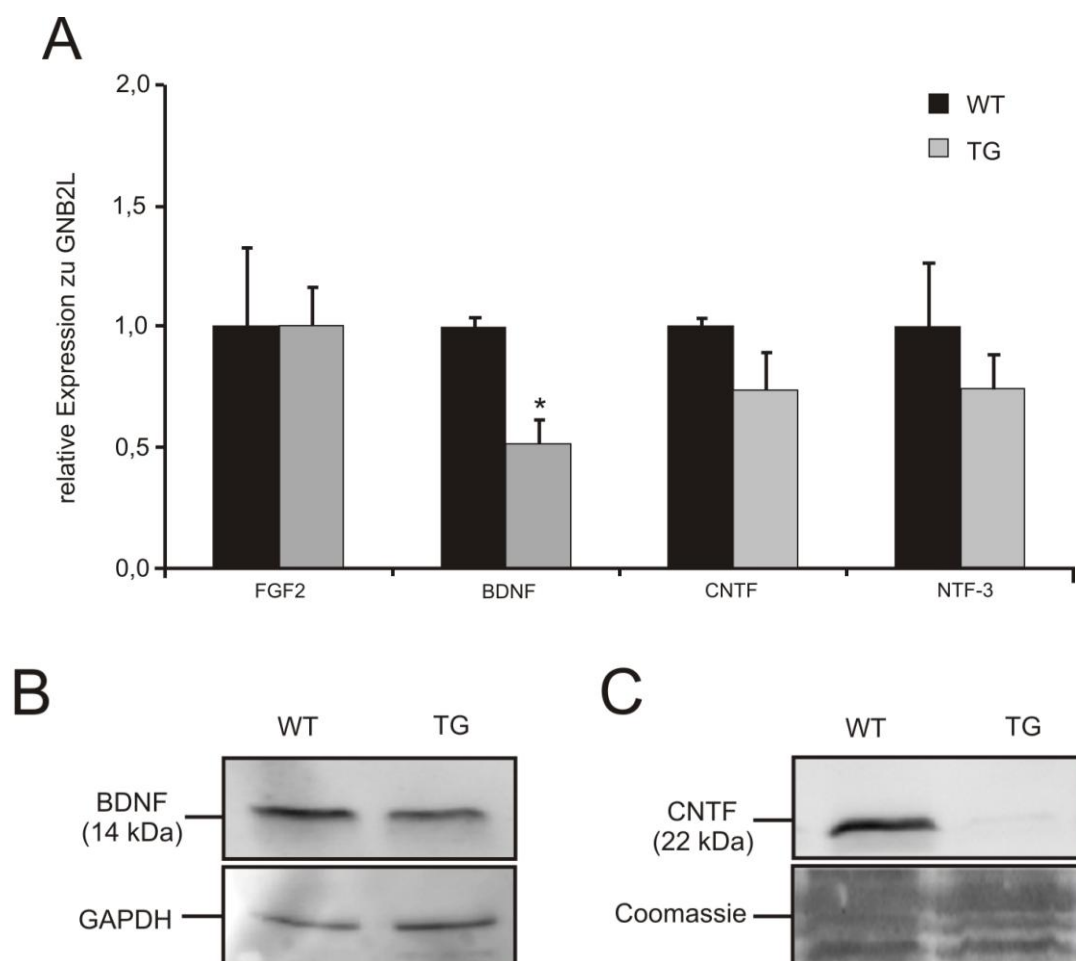


Abbildung 4-36: **Reduktion von BDNF, CNTF und NTF-3 in Retinae 8 Wochen alter CTGF-Überexpressionsmäuse.** (A) Die Auswertung der quantitativen Real-Time RT-PCR von Retinae 8 Wochen alter TG-Tiere präsentiert einen negativen Einfluss von CTGF auf die mRNA-Menge von BDNF ($0,49 \pm 0,21$, $p =$

0,04, n = 5), CNTF ($0,73 \pm 0,43$) und NTF-3 ($0,74 \pm 0,14$) im Vergleich zu den WT. FGF2 erfuhr im Vergleich zum Kontrolltier keine Modulation durch die Überexpression von CTGF ($1,0 \pm 0,17$). Als Referenzgen zur Normierung wurde GNB2L verwendet. Mittelwert \pm SD, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. (B) und (C) Die Proteinanalyse für die Regulierung von BDNF und CNTF in TG- und WT-Tieren verifiziert eine durch CTGF signifikante Abschwächung der Bandenintensität. Mittelwert \pm SEM, *: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Die quantitative Bestimmung der mRNA lieferte die Aussage, dass die Expression aller untersuchten neurotrophen Faktoren außer FGF2 durch die Überexpression von CTGF beeinflusst wurde (Abbildung 4-36). Die größte Inhibition durch den Wachstumsfaktor erfuhr BDNF. Hier konnte eine signifikante Inhibition auf $0,49 \pm 0,21$ ($p = 0,04$, n = 5) gegenüber dem WT erkannt werden. Auch die Intensität der Proteinbanden der zusätzlichen Western Blot Analyse unterstützte diese Aussage. Hier konnte eine um 27 %-ige signifikante Verringerung gegenüber dem WT festgestellt werden ($0,73 \pm 0,10$, $p = 0,02$, n = 7). Der Grad der Hemmung der CNTF- und NTF-3-Transkription, verglichen zum WT, belief sich in etwa auf 30 % (CNTF: $0,73 \pm 0,43$; NTF-3: $0,74 \pm 0,14$), während sich für die Expression von FGF2 kein Unterschied zeigte ($1,0 \pm 0,17$). Die veränderte Transkription von CNTF mündete auch in einer reduzierten Proteinmenge des neurotrophen Faktors ($0,46 \pm 0,19$).

Zusammenfassend sprechen die Daten dieses Teilabschnitts dafür, dass die Expression vieler neurotropher Faktoren, die für das Überleben von RGZ-Zellen unabdingbar sind, durch CTGF negativ beeinflusst werden.

4.3 Analyse der Effekte von CTGF im Sehnerv von β B1-Mäusen

Der letzte Gewebebereich mit dem sich in der vorliegenden Arbeit beschäftigt wurde, war der Bereich der Papille. Aus der Literatur ist bekannt, dass es in diesem Bereich des Auges im POWG ebenfalls zu Umstrukturierungen kommen kann (Zode *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2005, Fuchshofer 2011). Diese Veränderungen des Sehnervenkopfes könnten Auswirkungen auf den retrograden und anterograden Transport von neurotrophen Faktoren in den Axonen der RGZ-Zellen haben, was zum Untergang dieses Zelltyps beitragen könnte. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit dem medizinischen Doktoranden Gregor Weber erhoben.

4.3.1 Reduktion von BDNF im β B1-Mausmodell

BDNF hatte das Potential nach einmaliger Injektion RGZ-Zellen nach Axotomie einer Mausretina vor dem Zelltod zu schützen (Galindo-Romero *et al.*, 2013). Diese protektiven Eigenschaften der neurotrophen Faktoren auf die Ganglienzellen werden durch den axonalen retrograden und anterograden Transport übermittelt (Quigley *et al.*, 2000; Coxon, Duggan, Guo und Cordeiro, 2012). Wie die Analyse des RNA- und Proteingehalts von BDNF in der Retina von 8 Wochen alten TG-Tieren zeigte, war BDNF durch CTGF signifikant reduziert (vgl. Punkt 4.2.4.3).

Ob die Synthese des neurotrophen Faktors auch im Bereich der Papille gestört ist, sollte durch frontale Gewebeschnitte von *Nervi optici* mittels immunhistochemischer Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen BDNF geklärt werden (Abbildung 4-37).

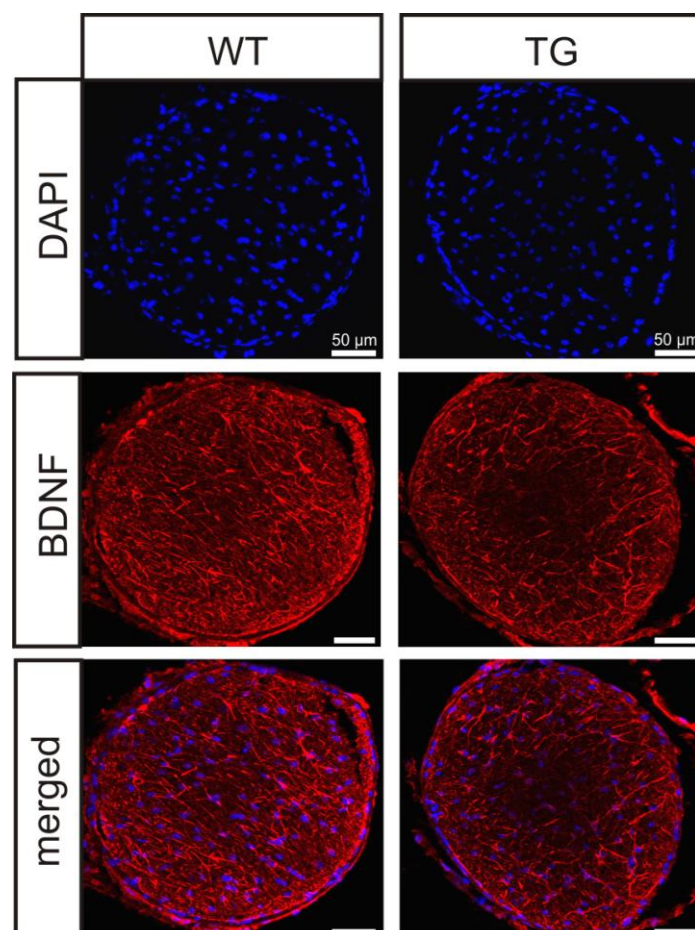


Abbildung 4-37: **BDNF war im *Nervus opticus* 8 Wochen alter transgener Tiere reduziert.** In der Immunhistochemischen Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen BDNF konnte eine Reduktion des neurotrophen Faktors in den CTGF-Überexpressionsmäusen gegenüber den Wildtypen notiert werden. Blau: DAPI, Rot: BDNF, Maßstabsbalken: 50 µm.

In den TG- wurde gegenüber den WT-Tieren eine signifikante Repression festgestellt. Auffällig war, dass diese Reduktion am stärksten im zentralen Bereich des Sehnervs zu erkennen war, was ein Hinweis auf eine durch mechanischen Stress erfolgte Reduktion des neurotrophen Faktors und damit auf die Störung des axonalen retrograden und anterograden Transports sein könnte.

5 Diskussion

5.1 Kurzzusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die funktionelle Rolle von CTGF, BMP4 bzw. -7 und TGF- β in der Pathogenese des POWGs anhand des CTGF-Überexpressionsmausmodells aufzuklären. Der Fokus lag dabei sowohl auf der Untersuchung der Auswirkungen von CTGF auf die homöostatische Balance zwischen TGF- β und den BMPs als auch auf der Analyse ob die in diesem Mausmodell beobachteten glaukomatösen Veränderungen auf einen direkten oder indirekten Effekt von CTGF zurückzuführen sind.

Es konnte gezeigt werden, dass CTGF im Bereich der Kammerwasserabflusswege zu einer starken Störung des Gleichgewichts von TGF- β und den BMPs führt. Die Signalantwort und die Expression der BMPs wurden durch CTGF effektiv blockiert, während die Transkription und die Aktivität der Signalantwort von TGF- β signifikant gesteigert wurden. Auch wurden die regulatorischen Faktoren, wie Smad6 und -7 von CTGF so beeinflusst, dass die fibrotischen Effekte von TGF- β begünstigt werden. Zusätzlich wurde Gremlin, ein spezifischer Inhibitor der BMPs, durch den Wachstumsfaktor hochreguliert, wodurch eine verstärkte Hemmung des BMP-Signalwegs nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Analyse des hinteren Augenabschnitts ergab, dass der Verlust an RGZ-Zellen im β B1-Mausmodell indirekt durch Erhöhung des IODs hervorgerufen wird. Jedoch konnte durch intravitreale Injektionen nachgewiesen werden, dass der Wachstumsfaktor in Kombination mit Stress mit einem durch CTGF direkt vermittelten gesteigerten Verlust an RGZ-Zellen einherging. Diese verminderte Zellviabilität wurde durch den Einsatz von BMP4 und -7 effektiv geschützt, womit deren protektive Eigenschaften gezeigt werden konnten. Des Weiteren wurde festgestellt, dass CTGF zu einer Reduktion von neurotrophen Faktoren führt, wodurch die Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen negativ beeinflusst werden kann.

Im Bereich der Papille konnte eine verminderte Expression des neurotrophen Faktors BDNF registriert werden, die mit einer morphologischen Modifikation der *Lamina cribrosa* assoziiert sein könnte.

5.2 Analyse der Effekte von CTGF auf die Expression und Signaltransduktion der BMPs bzw. TGF- β

5.2.1 Modulation der BMP-Expression und Signaltransduktion

CTGF fungiert als Downstream-Mediator von TGF- β (Grotendorst *et al.*, 1997, Junglas *et al.*, 2009) und verursacht durch eine Linsen-spezifische Überexpression im Mausmodell ein POWG mit allen Charakteristika (Junglas *et al.*, 2012). Weiterhin ist bekannt, dass BMP4 und -7 die Eigenschaft besitzen die fibrotischen Effekte von TGF- β im TW und im Sehnervenkopf effektiv zu blockieren. Dadurch konnte eine antagonistische Wirkung in Bezug auf die Veränderungen der extrazellulären Matrix zwischen den normalerweise in einem homöostatischen Gleichgewicht vorliegenden Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (Wordinger *et al.* 2007, Fuchshofer *et al.*, 2007). Deshalb war es interessant herauszufinden, welche Stellung die BMPs in der Pathogenese des POWGs einnehmen und wie CTGF diese beeinflussen kann.

Zahlreiche Publikationen deuten anhand von *in vitro*-Experimenten und Entwicklungsstudien *in situ* auf die Existenz der BMPs und deren Rezeptoren im TW, der Retina und dem Sehnervenkopf hin (Wordinger *et al.*, 2002; Hocking *et al.*, 2009; Zode *et al.*, 2009, Hocking und McFarlane 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten jedoch erstmals detailliert die Verteilung von BMP4 und -7 im vorderen und hinteren Augenabschnitt (VAA und HAA) und wiesen damit auf ein Vorkommen und eine basale Funktion in diesen Geweben hin. Im anterioren Bereich war das Signal für BMP4 vor allem im Bereich des Trabekelwerks (TWs) dominant, während BMP7 insbesondere im Ziliarkörper lokalisiert werden konnte. Diese Beobachtungen stützen Studien, die zeigten, dass BMP7 hauptsächlich eine Rolle bei der Entwicklung des Ziliarepithels einnimmt (Zhao *et al.*, 2002), während die Haploinsuffizienz von BMP4 zu einem veränderten Phänotyp des TWs und des Schlemm'schen Kanals führt, was mit einem erhöhten IOD einhergeht (Chang *et al.*, 2001). In der Netzhaut konnte das intensivste Signal beider Isoformen der BMPs in der inneren plexiformen Schicht (INL) beobachtet werden. BMPs sind an der Differenzierung von neuronalen Stammzellen in RGZ-Zellen und der Ausrichtung ihrer Axone beteiligt, wodurch ihr Vorkommen in diesem Bereich der Retina erklärt werden könnte. Des Weiteren konnte kürzlich dem Epidermal Growth Factor zusammen mit BMP7 eine Rolle bei der Proliferation der Müller-Glia-Zellen nachgewiesen werden (Ueki *et al.*, 2013), wodurch die Lokalisation von BMP4 und -7

in der äußeren plexiformen Schicht (ONL) begründet wäre. Die BMP-Isoformen könnten hier beispielsweise funktionell beim axonalen Wachstum dieses Zelltyps beteiligt sein. Unserer Arbeitsgruppe konnte durch eine weitere immunhistochemische Färbung die Expression von BMP7 im prä- und postlaminären Bereich der Papille aufzeigen (Daten nicht gezeigt). Dies wiederum spricht für eine homöostatische Balance zwischen diesen Faktoren, da festgestellt worden ist, dass die fibrotischen Effekte von TGF- β durch BMPs im TW und im Sehnervenkopf blockiert werden können (Wordinger *et al* 2007, Fuchshofer *et al.*, 2007). Diese Funktion ist auch besonders wichtig bei der Aufrechterhaltung eines normalen Abflusswiderstandes, was anhand der Haploinsuffizienz von BMP4, ebenso wie durch die Perfusion von Organkulturen aus menschlichen Augenvorderkammern mit Gremlin, einem spezifischen Antagonisten der BMPs bestätigt werden konnte. Durch die Inhibition und die damit einhergehende abwesenden Signalisierung der BMPs wurde der IOD gesteigert, der zu Ausbildung eines POWGs beitragen kann (Chang *et al.*, 2001; Wordinger *et al.*, 2007). Weiterhin ist bekannt, dass Gremlin vermehrt in glaukomatösen TW vorkommt und dort wiederum die blockierenden Effekte der BMPs auf eine TGF- β vermittelte erhöhte Ablagerung von Fibronectin inhibiert. Hierdurch wurde auch eine Steigerung des Kammerwasser-Abflusswiderstands hervorgerufen (Wordinger *et al.*, 2007). Da man innerhalb dieser Arbeit einen konstitutiv aktiven BMP-Signalweg in allen Glaukom-relevanten Geweben bestätigen konnte, war es von Interesse herauszufinden, welche funktionellen Auswirkungen die CTGF-Überexpression auf die Signalisierung der BMPs hat.

Bei der Analyse der VAA und HAA 8 Wochen alter β B1-Mäuse konnte eine signifikante Inhibition des BMP-Signalwegs als auch der BMP4- bzw. BMP7-Expression festgestellt werden, während die Transkription und Translation von Gremlin durch CTGF signifikant gesteigert wurde. Ähnliche Beobachtungen bei der Wechselwirkung zwischen diesen Faktoren konnte bereits in umgekehrter Richtung gemacht werden. So konnte die durch Retinol gesteigerte Expression von CTGF bei der Reifung von Chondrozyten durch den BMP-Signalweg minimiert werden (Shimo *et al.*, 2005), während Gremlin die Expression von TGF- β 2 und CTGF nach Behandlung von Trabekelwerkszellen (TWZ), und damit auch deren fibrotische Effekte induzierte (Sethi *et al.*, 2011).

Es ist wenig über die CTGF-abhängige Inhibition der BMPs bekannt, jedoch geht in Glomeruli der Niere eine erhöhte Synthese von CTGF mit einer verminderten BMP-

Antwort einher (Turk *et al.*, 2009). Wie CTGF die Blockierung von BMP4 und -7 initiiert, ist allerdings noch weitgehend unklar. Versuche an Chondrozyten wiesen eine direkte Interaktion von CTGF mit BMP2 nach (Maeda *et al.*, 2008). Ähnliche Ergebnisse hat unsere Arbeitsgruppe kürzlich bei Interaktionsanalysen von BMP4 und CTGF erhalten, was dafür spricht, dass diese Wechselwirkung zwischen den Wachstumsfaktoren ursächlich für eine durch CTGF hervorgerufene Inhibition der BMP-Signalantwort sein könnte (Daten nicht gezeigt). Andererseits könnten die gegenseitigen Effekte von CTGF und BMP4 auch auf Signalwegebene modifiziert werden. Liu *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass eine TGF- β Activated Kinase (TAK-1)-vermittelte erhöhte Synthese von BMP4 mit einer Inhibition des Mek/Erk-Signalwegs einhergeht (Liu *et al.*, 2012). Nachdem CTGF seine Funktion als Downstream-Mediator von TGF- β unter anderem über diesen Signalweg überträgt, könnte dies ein Hinweis auf die Regulation der BMP-Expression bzw. deren Signalantwort durch CTGF sein (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004). Doch um dies mit Gewissheit zu postulieren, sind zusätzliche Versuche nötig.

Durch eine weitere Untersuchung dieser Arbeit an Zellkulturexperimenten mit HTM-N-Zellen konnte festgestellt werden, dass CTGF die Inhibition des BMP-Signalwegs genauso effektiv bewerkstelligt wie Noggin, was wiederum für eine direkte Interaktion zwischen CTGF und den BMPs sprechen würde. Dass sowohl die Überexpression von Noggin als auch die starke Überexpression von CTGF im Mausmodell zu einem veränderten morphologischen Phänotyp, bei dem kein Ziliarkörper mehr zu erkennen war, beitrug (Zhao *et al.*, 2002; Krause *et al.*, 2011; Daten unserer Arbeitsgruppe, nicht gezeigt), gibt, wie die Studie von Abreu, ebenfalls Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen CTGF und den BMPs. So konnte Abreu *et al.* beispielsweise nachweisen, dass die direkte Bindung von CTGF, durch dessen CR-Domäne an BMP4, die BMP-Signaltransduktion hemmen kann, während die direkte Bindung an TGF β 1 zu einer Verstärkung des TGF β -Signalwegs beitrug (Abreu *et al.*, 2002).

5.2.2 Effekte auf die TGF- β -Expression und -Signaltransduktion

Anhand der Ergebnisse der BMP-Analyse in den CTGF-Überexpressionsmäusen (TG) wird die Annahme gefestigt, dass die homöostatische Balance zwischen TGF- β und den BMPs im POWG gestört ist.

Es zeigte sich, dass TGF- β 1 und -2 in den TG- verglichen mit den WT-Tieren signifikant erhöht war. Für TGF- β 2 konnte zusätzlich eine gesteigerte Synthese in

allen Kammerwasserabfluss relevanten Geweben der β B1-Maus beobachtet werden. Durch die Behandlung von HTM-N-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von CTGF ließ sich eine dosisabhängige Steigerung für TGF- β 1 und -2 erkennen, wodurch ein sekundärer Effekt des Wachstumsfaktors ausgeschlossen werden konnte. Interessanterweise konnte ebenfalls ein autoinduktiver aber dosiskompensierter Anstieg von CTGF verzeichnet werden. Bei der Suche nach Signalwegen, die die Regulation von TGF- β beeinflussen können, gaben folgende Publikationen Hinweise: Guo *et al.* konnten anhand einer Studie mit humanen alveolaren Epithelzellen demonstrieren, dass TGF- β 1, als kritischer Faktor innerhalb eines akuten Lungenversagens, durch das Ox-LDL-induzierte Lipoprotein gesteigert wurde. Verantwortlich für diese Erhöhung war die Aktivierung des Signalwegs des kleinen G-Proteins Ras und der „Extracellular signal-regulated Kinase“ (Erk) (Guo *et al.*, 2012). Ein durch den Ras/Erk-Signalweg vermittelte Autoinduktion von TGF- β 1 und eine damit assoziierte vermehrte Expression von CTGF konnte ebenfalls an renalen humanen Epithelzellen des Nierentubulus beobachtet werden (Dockrell *et al.*, 2009). Die Rolle des RhoA/ROCK-Signalwegs bei der Erhöhung des TGF- β -Levels wird ebenfalls diskutiert. So untersuchten beispielsweise Cho *et al.* die Rolle von E-Cadherinen (ECADs) in der Pathogenese der Leberfibrose. Dabei konnten sie zeigen, dass der bei diesem Krankheitsbild auftretende Mangel an ECADs verantwortlich für eine durch den RhoA/ROCK-Signalweg vermittelte Induktion von TGF- β war (Cho *et al.*, 2010).

Die erhöhte Menge an TGF- β 1 und -2 war auch mit einer gesteigerten TGF- β -Signalantwort assoziiert, was sich durch Proteinanalysen von VAA zeigen ließ. Die erhöhte Aktivität des TGF- β -Signalwegs konnte zusätzlich durch eine immunhistochemische Färbung gegen pSmad2 für die Region des Kammerwasserabflusses, der GCL-, der INL- und der IPL-Schicht der Retina bestätigt werden. Das Vorkommen von TGF- β und derer für die Signalantwort benötigten Smad2 und -3 Proteine in diesen Geweben ist bereits mehrfach beschrieben worden (Pfeffer *et al.*, 1994; Cousins *et al.*, 1991; Granstein *et al.*, 1990, Jampel *et al.*, 1990; Tovar-Vidales *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Für die Pathogenese des POWGs könnten diese CTGF-vermittelten Effekte im Kammerwasserabflussgewebe zu stärkeren Veränderungen der EZM und der Kontraktilität führen, wodurch ein erhöhter Abflusswiderstand entstehen würde. Die funktionelle Rolle von TGF- β in der Netzhaut beim POWG ist jedoch noch unklar. Es gibt Anzeichen dafür,

dass sich der Wachstumsfaktor positiv auf die Viabilität von RGZ-Zellen und auf Neuronen der inneren Retina auswirken kann (Walshe *et al.*, 2011; Braunger *et al.*, 2013). Um diesen Punkt aufzuklären sind weitere Untersuchungen nötig.

5.2.3 Effekte von CTGF auf die inhibitorischen Smad6 und -7

Als molekularer Schalter zwischen TGF- β 2 und BMP7 konnte das inhibitorische Smad7 Protein identifiziert werden (Fuchshofer *et al.*, 2009). Smad6 dagegen kann den Typ I Rezeptor der BMPs binden und unterdrückt somit spezifisch die Signalantwort der BMPs (Estrada *et al.*, 2011). Bei dieser Arbeit wurde im VAA der TG-Tiere eine hochsignifikante durch CTGF hervorgerufene Induktion von Smad6 registriert, während für Smad7 nur ein schwacher Anstieg zu erkennen war. Auf Proteinebene konnte für Smad7 kein Unterschied zwischen den β B1- und den WT-Mäusen verzeichnet werden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der BMP-Signalweg einer zusätzlichen Blockierung in den Kammerwasserabflussgeweben ausgesetzt ist, während der TGF- β -Signalweg keiner Kontrolle unterliegt, wodurch die fibrotischen Eigenschaften des Wachstumsfaktors noch weiter intensiviert werden könnten.

In der Netzhaut war der molekulare Schalter zwischen TGF- β und den BMPs dagegen signifikant reduziert. Dieser Unterschied in der Expression von Smad7 zwischen dem VAA und HAA könnte eventuell mit einer unterschiedlichen Regulation des TGF- β -Signalwegs zusammenhängen. Während TGF- β seine Wirkung im TW vornehmlich über die Modulation des RhoA/ROCK- und des Erk-Signalwegs überträgt, scheint der Wachstumsfaktor seine Funktionen in der Retina über die Wechselwirkung mit dem Nerve Growth Factor (NGF) zu vermitteln. Es wird vermutet, dass hierbei Smad7 als Mediator fungiert. Es konnte festgestellt werden, dass es in Smad7-defizienten Mäusen zu einem Anstieg an NGF kam, was mit einer erhöhten TGF- β -Signalantwort einherging, wohingegen Mäuse mit einer Defizienz des TGF- β RII einen verminderten Level des neuroprotektiven Faktors aufwiesen, was auf eine Smad7-abhängige Regulation von TGF- β durch NGF hindeutet und eine Erklärung für die unterschiedliche Modifikation des inhibitorischen Smad-Proteins sein könnte (Braunger *et al.*, 2013).

Die Unterdrückung des BMP-Signalwegs durch den Wachstumsfaktor begünstigt die Akkumulation von EZM-Bestandteilen und die beobachtete, modulierte Kontraktionsfähigkeit im VAA. Durch die zusätzlich verstärkte Blockierung der BMPs

bzw. des BMP-Signalwegs durch Gremlin und Smad6 wird diese Auswirkung durch den Downstream-Mediator von TGF- β gefördert.

5.3 Analyse der Effekte von CTGF, BMP4 und -7 auf die Viabilität der RGZ-Zellen

5.3.1 Auswirkungen der BMPs auf die Viabilität der RGZ-Zellen

Das POWG ist durch den Verlust der Axone der RGZ-Zellen charakterisiert. Ob eine Reduktion des BMP-Signalwegs, wie wir sie in unserem Tiermodell nachweisen konnten, einen Einfluss auf das Überleben der RGZ-Zellen haben kann, war bis heute nicht bekannt. Jedoch gibt es erste Hinweise, dass BMPs eine neuroprotektive Rolle einnehmen. So konnten beispielsweise Nervenzellen vor hypoglykämischen oder ischämischen Schäden durch BMP7 geschützt werden (Nonner *et al.*, 2001), oder eine Minimierung der apoptotischen RGZ-Zellen nach exzitotoxischen Schaden durch die endogene Aktivierung des BMP-Signalwegs und eine Erhöhung der absterbenden RGZ-Zellen nach Injektion von NMDA in Kombination mit BMP-Inhibitoren erreicht werden (Ueki und Reh, 2012). Darüber hinaus konnten die durch NMDA-Schaden proliferierenden Müller-Glia-Zellen anhand einer intravitrealen Injektion von BMP4 und BMP7 reduziert und in Richtung von Vorläuferzellen geshiftet werden, was die Ausschüttung von neurotrophen Faktoren begünstigt und zum Überleben von RGZ beitragen könnte (Fischer *et al.*, 2004). Eine weitere interessante Beobachtung war, dass diese Faktoren am Auswachsen von Dendriten der RGZ-Zellen beteiligt zu sein scheinen (Nonner *et al.*, 2001). Bei Untersuchungen an einer BMP-Rezeptor1a-defizienten und BMP-Rezeptor1b-heterozygoten Maus ließ sich ein fehlerhaftes Auswachsen der ventral-gelegenen RGZ-Zellen beobachten, wodurch die rezeptiven Felder der Neuronen im *Colliculus superiores* fälschlicherweise durch die dorsal-gelegenen RGZ-Zellen angeregt wurden (Chandrasekaran *et al.*, 2009).

Unsere Analyse der BMP-Funktionen im nicht erkrankten Auge lieferten keine aussagekräftigen Daten zur Neuroprotektivität der Wachstumsfaktoren.

Die Tatsache, dass die BMPs neuroprotektive Eigenschaften auf die RGZ-Zellen besitzen, ließ sich allerdings anhand der *in vivo* und *in vitro* erhaltenen Ergebnisse im NMDA-Schadensmodell verifizieren. Einerseits konnte an immortalisierten retinalen neuronalen Zellen gezeigt werden, dass die Signalantwort durch die Behandlung mit

BMP7 gesteigert wurde und, andererseits die Viabilität der RGZ-Zellen nach exzitotoxischer Schädigung sowohl in Zellkultur als auch im Mausmodell durch BMP7 erhalten wurde. Interessanterweise war der *in vitro* beobachtete protektive Effekt der BMPs gegenüber der Inkubation von BDNF und CNTF größer. Für diese neurotrophen Faktoren wurde der protektive Effekt auf RGZ-Zellen schon mehrfach nachgewiesen (Parrilla-Reverter *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005) und konnten deshalb als Referenz herangezogen werden. Ebenso findet NMDA häufig modellhaft in der Glaukomforschung Anwendung, da das synthetische Glutamat-Analogon zu einer selektiven exzitotoxischen Schädigung von RGZ-Zellen führt (Crisanti *et al.*, 2006; Barnett *et al.*, 2009, Kitaoka *et al.*, 2007). Solch eine Überaktivierung von NMDA-Glutamat-Rezeptoren durch eine pathologisch-erhöhte Glutamat-Konzentration wird als Ursache vieler neurodegenerativer Erkrankungen des Auges diskutiert (Dreyer *et al.*, 1998; Seki und Lipton *et al.* 2008). Der in dieser Arbeit beobachtete Schutz der Viabilität der RGZ-Zellen durch BMP7 nach NMDA-Schaden könnte also auch beim POWG eine Rolle spielen.

5.3.2 Einfluss von CTGF auf die Viabilität der RGZ-Zellen

Um abschließend zu klären, ob der in der CTGF-Überexpressionsmaus erkennbare sukzessive Verlust der RGZ-Zellen direkt oder indirekt von CTGF beeinflusst wurde, brachte man PBS und rekombinantes CTGF in den Glaskörper von CD-1-WT-Mäusen ein. Nachdem der Wachstumsfaktor hier, wie auch die BMPs, keinen erheblichen Einfluss auf die Gesamtaxonanzahl im *Nervus opticus* hatte, konnte darauf geschlossen werden, dass die Degeneration der Axone im CTGF-Mausmodell indirekt über die Erhöhung des IODs provoziert wurde.

Jedoch war es interessant dem Aspekt nachzugehen, welche Rolle das endogene CTGF im glaukomatösen Auge einnimmt. Bisher gibt es nur eine Publikation die Hinweise auf die Auswirkungen des Wachstumsfaktors in der Netzhaut gibt. Hauck *et al.* beschrieben eine neuroprotektive Wirkung von CTGF auf Müller-Glia-Zellen und auf Photorezeptoren (Hauck *et al.*, 2008). Studien in anderen Geweben legen allerdings die Vermutung nahe, dass der Wachstumsfaktor eine Neurodegeneration fördern kann. So konnte bei einem Lipopolysaccharid-induzierten Schaden an dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* im Hirn ein gesteigerter CTGF Spiegel festgestellt werden (McClain *et al.*, 2009). Weiterhin entdeckte man eine erniedrigte Konzentration von CTGF in Neuronen mittels mRNA-Microarray Assay nach

Überexpression von Neuroglobin im Mausmodell verglichen zu den wildtypischen Mäusen. Neuroglobin schützt Neuronen spezifisch gegen Hypoxie bzw. Ischämie. Eine reduzierte CTGF-Expression in diesen Neuronen könnte ebenfalls eine proapoptotische Rolle von CTGF anzeigen (Yu *et al.*, 2009). Die Daten dieser Arbeit deuten ebenfalls daraufhin, dass CTGF einen negativen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der RGZ-Zellen hat, wobei dieser Effekt durch den Einsatz von BMPs wieder revertiert werden konnte. Auch konnte festgestellt werden, dass CTGF womöglich durch die Inhibition der BMP-Signaltransduktion deren protektiven Effekt unterbinden und so proapoptotische Auswirkungen auf die RGZ-Zellen haben kann. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den von Hauck *et al.* registrierten neuroprotektiven Potential von CTGF auf Müller-Glia- und Photorezeptor-Zellen (Hauck *et al.*, 2008). Hier muss allerdings bedacht werden, dass sich die Analyse der Neuroprotektivität auf eine andere in der Retina vorkommende Neuronenpopulation stützt, und nicht unter Stressbedingungen durchgeführt wurde. Die Beobachtungen von Yu *et al.* und McClain *et al.* können durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert werden.

Es kann folglich postuliert werden, dass CTGF in Kombination mit akutem Stress einem erhöhten RGZ-Zellschaden durch die Blockierung des BMP-Signalwegs unter akuten Stressbedingungen verursacht. Im Hinblick auf das POWG bedeutet dies, dass CTGF durch eine chronische Stressbelastung wie beispielsweise dem gesteigerten IOD im POWG induziert werden und somit indirekt zu einer Verstärkung der Exkavation im *Nervus opticus* beitragen könnte.

5.4 Wirkung von CTGF auf neurotrophe Faktoren

Die Vitalität von RGZ-Zellen ist unter physiologischen Bedingungen mit der kontinuierlichen Exposition von neurotrophen Faktoren verknüpft. Diese Proteine werden für die Entwicklung und Differenzierung bzw. für die Aufrechterhaltung der Funktion in den RGZ-Zellen benötigt (Cellerino *et al.*, 1997; Kirsch *et al.*, 1997). Kommt es zu einem Mangel an neurotrophen Faktoren geht die RGZ-Zelle zugrunde und es wird Apoptose eingeleitet. Als Grund hierfür wird in der Pathogenese des POWGs eine Störung des retro- und anterograden Transportes diskutiert (Coxon *et al.*, 2010; Quigley *et al.*, 2000). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass CTGF unter Stress proapoptotische Eigenschaften besitzt, sollte untersucht werden,

ob der Wachstumsfaktor auch Einfluss auf die Expression von neurotrophen Faktoren hat.

Es konnte bereits für zahlreiche Faktoren eine antiapoptotische Wirkung beschrieben werden. So wurden beispielsweise protektive Eigenschaften von PEDF nach exzitotoxischer Schädigung von Maus-Ganglienzellen nachgewiesen (Pang *et al.*, 2007). Auch schützte LEDGF Photorezeptoren nach Lichtschaden (Ahuja *et al.*, 2001) und die Viabilität von RGZ-Zellen nach artifizieller Erhöhung des IODs konnte durch Glaskörper-Injektion von GDNF-beladenen Mikropartikeln verbessert werden (Jiang *et al.*, 2007).

Es zeigte sich ein direkter Einfluss auf PEDF, GDNF und LEDGF *in vitro* nach CTGF-Behandlung unter serumfreien Vorraussetzungen. Im NMDA-Schadensmodell konnte ebenfalls eine Abnahme durch NMDA alleine, die durch die zusätzliche Gabe von CTGF noch gesteigert werden konnte, detektiert werden. Die stärkste Reduktion erfolgte jedoch durch CTGF alleine, was eventuell Ursache einer geringeren NMDA-Konzentration, verglichen mit der *in vivo* verwendete Menge, war. Dieses Experiment bestätigt eine direkte Auswirkung von CTGF auf die Expression neurotropher Faktoren. Dies bedeutet, dass der Wachstumsfaktor einen Mangel an neurotrophen Faktoren in der Retina auslösen kann, der zu einer erhöhten Schädigung der RGZ-Zellen beitragen könnte.

Es wurde beschrieben, dass NTF-3 maßgeblich an der Ausbildung dendritischer Verzweigungen von RGZ-Zellen und an der Differenzierung und dem Überleben von Neuronen beteiligt ist (Liu *et al.*, 2010). FGF2 vermittelt seine protektiven Eigenschaften auf retinale Neurone, im Gegensatz zu LEDGF nicht direkt, sondern indirekt durch die Inhibition von Apoptose-einleitenden Signalkaskaden (Ahuja *et al.*, 2001; Chaum *et al.*, 2003; Lebrun-Julien und DiPolo, 2008).

Die intravitreale Injektion von CTGF alleine führte zu einer signifikanten Abnahme von NTF-3, während die Expression von FGF2 gesteigert und der mRNA Gehalt von LEDGF nicht beeinflusst wurde. Die Applikation des synthetischen Glutamat analogons initiierte wiederum eine Erniedrigung aller drei untersuchten Faktoren. Bei der kombinierten Injektion von NMDA und CTGF konnte nur für NTF-3 eine verstärkte Minimierung verzeichnet werden, wohingegen die zusätzliche Gabe von CTGF eine Erhöhung von LEDGF und FGF2 verursachte. Die Analyse der *in vivo* Studie war demnach nicht so eindeutig wie die *in vitro* erhobenen Daten. Man muss jedoch bedenken, dass hier die Zellen im Zellverbund untersucht wurde, da die

Gesamt-RNA der Retina isoliert und auf den Expressionsgehalt der untersuchten Faktoren hin überprüft wurden. So könnte beispielsweise die Ausschüttung neurotropher Faktoren durch eine stressbedingte Aktivierung von Müller-Glia-Zellen eine Rolle spielen (Lindqvist *et al.*, 2010). Überraschenderweise steigerte CTGF die Expression von FGF2, jedoch war diese Beobachtung nicht signifikant und muss noch intensiver untersucht werden. Eine Erklärung hierfür könnte sich jedoch daraus ableiten, dass die beiden Faktoren agonistisch wirken und ihre Expression gegenseitig induziert werden kann (Dangaria *et al.*, 2009; Chujo *et al.*, 2009). Aoyama *et al.* konnten zeigen, dass CTGF an den Rezeptor von FGF2 binden und durch einen kollaborativen Effekt mit FGF2 die Phosphorylierung von ERK beeinflussen kann (Aoyama *et al.*, 2012). Für LEDGF konnte bisher eine negative-Regulation auf die Expression des Faktors durch TGF- β 1 in humanen Linsenepithelzellen gezeigt werden (Sharma *et al.*, 2003). Als Transkriptionsaktivator bindet LEDGF an cis-Stress-Response und Heat-Shock Elemente der DNA. Dies impliziert eine Stress-abhängige Rekrutierung von LEDGF und könnte erklären, warum bei der alleinigen Injektion mit CTGF keine Modifikation des neurotrophen Faktors zu erkennen war. Durch den Einsatz von NMDA wurden die RGZ-Zellen akutem Stress ausgesetzt, was mit einem Abfall von LEDGF korrelierte und die Theorie der Notwendigkeit des Faktors bei Stress unterstützt. Die Beobachtung, dass die Expression von LEDGF nach zusätzlicher CTGF-Injektion erhöht werden konnte, deutet auf synergistische Effekte bei akutem Stress hin. Da aber bis heute kein Zusammenhang zwischen der Überlebensrate der RGZ-Zellen und LEDGF bekannt ist, kann noch nicht abschließend bewertet werden, ob CTGF die Viabilität der RGZ-Zellen durch eine Depletion des neurotrophen Faktors vermindert.

Zur Untersuchung der Auswirkung von chronischem Stress auf die Expression von neurotrophen Faktoren wurde das β B1-Mausmodell herangezogen. In den Retinae von 8-Wochen alten TG-Mäusen konnte eine Deprivation von BDNF, CNTF und NTF-3 registriert werden. BDNF schützt beispielsweise RGZ-Zellen vor dem Zelltod durch einmalige intravitreale Injektion nach Axotomie einer Maus-Retina (Galindo-Romero *et al.*, 2013). Auch die Überexpression von CNTF durch die Injektion Adeno-assoziiierter Viren nach Induktion des Glaukoms mittels Laser mündete in einem geringerem Verlust an RGZ-Zellen (Pease *et al.*, 2009), während NTF-3 vor allem eine Rolle beim anterograden Transport zur Ausbildung von Dendriten und der Synapse zu spielen scheint (von Bartheld *et al.*, 2000). Die beobachtete Modifikation

dieser drei neurotrophen Faktoren in den TG-Tieren untermauert damit die Annahme, dass der im CTGF-Überexpressionsmausmodell generierte chronische Stress zu einem gesteigerten Verlust an RGZ-Zellen beiträgt. Für FGF2 konnte im Vergleich zum WT, wie bei den *in vitro* Versuchen, keine Regulation durch chronischen Stress registriert werden.

Interessanterweise konnte im Bereich der Papille durch immunhistochemische Färbungen gegen BDNF festgestellt werden, dass das Signal von BDNF in den TG-Tieren verglichen mit den WT stark reduziert war. Es wird angenommen, dass die Störung des antero- und retrograden Transportes der neurotrophen Faktoren und der damit einhergehende Mangel der für das Überleben der RGZ-Zellen benötigten Faktoren durch pathologische Veränderungen, welche einen mechanischen Stress auf die Axone im *Nervus opticus* bedingen, ausgelöst wird (Almasieh *et al.*, 2011). Eine ähnliche Störung des retrograden Transports für BDNF konnten Quigley *et al.* ebenfalls nach akuter IOD-Erhöhung beobachten (Quigley *et al.*, 2000). Auffällig war des Weiteren, dass der größte Mangel an diesem neurotrophen Faktor vor allem im zentralen Bereich vermerkt werden konnte. Eine Studie von Iwabe *et al.* beschreibt ebenso eine Deprivation an BDNF in Hunden eines Glaukommodells und eine damit korrelierende Anhäufung des TrkB-Rezeptor im Sehnervenkopf, was Hinweise auf eine auto- und/oder parakrine Signalisierung mit der *Lamina cribrosa* neben seinen anderen Funktionen wie der Protektion der RGZ-Zellen bedeuten könnte (Iwabe *et al.*, 2007). Zusammengenommen spricht dieser Befund für eine hohe Druckerzeugung im Zentrum des *Nervus opticus* durch pathologische Modifikationen im Bereich der Papille und einer damit einhergehenden Störung des Flusses der neurotrophen Faktoren.

5.5 Ausblick

CTGF generiert indirekt über die Vermittlung pathologischer Veränderungen und den folglich ansteigenden IOD ein POWG im Mausmodell (Junglas *et al.*, 2012). Innerhalb dieser Arbeit wurde festgestellt, dass es in diesem Tiermodell zu einer drastischen Störung des homöostatischen Gleichgewichts zwischen den BMPs und TGF- β kommt. CTGF scheint dabei der kritische Faktor zu sein. Durch Inhibition des BMP- und einer weiteren Induktion des TGF- β -Signalwegs greift CTGF direkt in das System ein und begünstigt die fibrotischen Effekte von TGF- β . Außerdem konnte registriert werden, dass CTGF in Kombination mit Stress zu einer erhöhten

Absterberate der RGZ-Zellen führt, während die BMPs neuroprotektive Eigenschaften auf diese Zellen besitzen. Im Papillenbereich wird die Expression von BDNF gesenkt, die vermutlich durch Veränderungen der *Lamina cribrosa* initiiert werden, die zu einer Störung des retro- bzw. anterograden Transports von neurotrophen Faktoren beiträgt und damit auch eine Exkavation in *Nervus opticus* fördert.

Darum ist es nötig in weiteren Analysen zu untersuchen, wie CTGF diese Effekte vermittelt. Man geht davon aus, dass vor allem die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren wie den Integrinen oder dem TrkA-Rezeptor eine Rolle bei der CTGF-Signalvermittlung spielen (Babic *et al.* 1999; Jedsadayanmata *et al.* 1999; Gao und Brigstock 2005; Heng *et al.* 2006; Wahab *et al.*, 2005). Durch den Einsatz von Nanopartikeln, die die Signalsequenz gegen Integrin $\alpha V\beta 3$ tragen, könnten beispielsweise die Integrine abgeblockt werden (Pollinger *et al.*, 2013), während der TrkA-Rezeptor durch Gabe von Testosteron unwirksam wird (Anagnostopoulou *et al.*, 2013). CTGF könnte seine Funktionen dann nicht mehr weitergeben, was den potenziellen Rezeptor anzeigen würde.

Um zu eruieren welche basalen Funktionen CTGF auf die einzelnen Bereiche im Auge hat, soll das konditionelle Knockout-Modell untersucht werden. Durch die Verpaarung einer CTGF flox/flox-Maus mit anderen Tieren, welche die Cre-Rekombinase unter verschiedenen gewebespezifischen Promotoren tragen, besteht die Möglichkeit die Funktion von CTGF im VAA und HAA auf die jeweiligen Gewebe zu untersuchen. Die Kreuzung der $\beta B1$ - mit der LacZ-CTGF-Maus gibt uns weiterhin die Möglichkeit die Funktion des Wachstumsfaktors im Papillenbereich intensiver zu beobachten. Das durch das LacZ-Gen exprimierte und später translatierte Enzym β -Galaktosidase kann mittels chemischer Reaktion X-Gal in Galactose und einen blauen Indigofarbstoff spalten, wodurch *in vivo* die Expression von CTGF sichtbar gemacht werden kann. Sollte CTGF im Glaukommausmodell durch Stress im Papillenbereich hochreguliert werden, könnte dies Aufklärung über die Ursache von fibrotischen Veränderungen innerhalb dieser Region geben, die zu einem mechanischen Stress und damit zu einer Störung des antero- und retrograden Transports in diesem Bereich beitragen könnten.

Nachdem CTGF das Potenzial hatte, auch Inhibitoren der BMPs zu beeinflussen, stellt sich die Frage nach spezifischen Antagonisten von CTGF. Diese könnten ebenfalls mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse nach dem konditionellen Knockout

von CTGF untersucht werden. Der Einsatz solcher Gegenspieler könnte die pathologischen Veränderungen im POWG abmildern und zu einem verlangsamten Absterben von RGZ-Zellen führen.

Auch könnte die Modifikation von BMP4 und -7 ein weiteres vielversprechendes Ziel bei der Entwicklung neuer Therapieansätze in Bezug auf das POWG sein, da nachgewiesen wurde, dass diese Signalproteine neuroprotektive Eigenschaften auf RGZ-Zellen besitzen.

6 Literaturverzeichnis

- Abreu, J. G., Ketpura, N. I., Reversade, B., *et al.* (2002). "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta." Nat Cell Biol **4**: 599-604.
- Acott, T. S. *et al.* (1992). "Trabecular extracellular matrix regulation." Williams & Wilkins Baltimore Pharmacology of Glaucoma: 125-157.
- Acott T. S., Kelley M. J. (2008). „Extracellular matrix in the trabecular meshwork.“ Exp Eye Res **86** (4): 543-61.
- Ahuja P., *et al.* (2001). "Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina." NeuroReport **12** (13): 2951-55.
- Alevizopoulos, A., Mermoud, N. (1997). "Transforming growth factor-beta: breaking open of a black box." Bioessays **19**: 581-91.
- Allen, J., B., Davidson, M., G., Nasisse, M., P., Fleisher, L., N., McGahan, M., C. (1998). "The lens influences aqueous humor levels of transforming growth factor-beta 2." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **236**: 305-1.
- Anagnostopoulou V. *et al.* (2013). "Differential effects of dehydroepiandrosterone and testosterone in prostate and colon cancer cell apoptosis: role of nerve growth factor (NGF) receptors." Endocrinology **154** (7): 2446-56.
- Aoyama E., Kubota S., Takigawa M. (2012). "CCN2/CTGF binds to fibroblast growth factor receptor 2 and modulates its signaling." FEBS Lett **586** (24): 4270-5.
- Augustin, A. J. (2007). "Augenheilkunde. 3. Auflage." Heidelberg, Berlin, Springer Verlag, Kapitel 12: 309-336.
- Babic A. M., Chen C. C., L. F. Lau (1999). "Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo." Mol Cell Biol **19**(4): 2958-66.
- Babihayev M. A, Brodskaya M. W. (1989). "Fibronectin detection in drainage outflow system of human eyes in ageing and progression of open angle glaucoma." Mech Ageing Dev. **47**: 145-157.
- Baghy, K., Iozzo, R. V, & Kovalszky, I. (2012). "Decorin-TGFβ axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. The journal of histochemistry and cytochemistry." official journal of the Histochemistry Society **60** (4): 262–8.
- Balemans W., Van Hul W. (2002). "Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators." Developmental Biology **250** (2): 231-250.
- Barnett E. M. *et al.* (2009). "Single-cell imaging of retinal ganglion cell apoptosis with a cell-penetrating, activatable peptide probe in an in vivo glaucoma model." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106** (23): 9391-9396.
- Blom I. E., Goldschmedig R., Leask A. (2002). "Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy?" International Society for Matrix Biology **21** (6): 473-482.
- Bork, P. (1993). "The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor." FEBS Lett **327**:125-130.
- Boycott, B. B. und Wässle, H. (1974). "The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina." J Physiol (Lond) **240**(2): 397-419.
- Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L. Grotendorst, G. R. (1991). "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular

- endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10." J Cell Biol **114**: 1285-1294.
- Bradley J. M., Vranka J., Colvis C. M., Conger D. M., Alexander J. P., Fisk A. S., Samples J. R., Acott T. S. (1998). "Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**: 2649-2658.
- Braunger B. M., Pielmeier S., Demmer C., Landstorfer V., Kawall D., Abramov N., Leibinger M., Kleiter I. et al. (2013). "TGF- β signaling protects retinal neurons from programmed cell death during the development of the mammalian eye." J Neurosci **33** (5): 14246-58.
- Brenner D.A. (2009). "Molecular pathogenesis of liver fibrosis." Trans Am Clin Climatol Assoc **120**: 361-8.
- Brigstock, D. R., Goldschmeding, R., Katsube, K. I., et al (2003): "Proposal for a unified CCN nomenclature." Mol Pathol **56**:127-128.
- Brigstock, D. R., Steffen, C. L., Kim, G. Y., et al. (1997). "Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor." J Biol Chem **272**: 20275-20282.
- Browne J. G., Ho S. L., Kane R., Oliver N., Clark A. F., O'Brien C. J., Crean J. K. (2011). "Connective Tissue Growth Factor is increased in Pseudoexfoliation Glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci (Epub).
- Cambell, N. (1997). "Biologie". Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Cellerino A. et al. (1997). "Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." Molecular And Cellular Neurosciences **9**, (5-6): 397-408.
- Chang B, Smith R. S., Peters M., Savinova O. V., Hawes N. L., Zabaleta A et al., (2001). "Haploinsufficient Bmp4 ocular phenotypes include anterior segment dysgenesis with elevated intraocular pressure." BMC Genet **2** (18).
- Chandrasekaran A. R., Furuta Y., Crair M. C. (2009). "Consequence of axon guidance defects on the development of retinotopic receptive field in the mouse colliculus." J Physiol **587** (5): 953-63.
- Chaum E. (2003). "Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective." Journal of Cellular Biochemistry **88** (1): 57-75.
- Chen, C. C., Chen, N., Lau, L. F. (2001). "The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts." J Biol Chem **276**: 10443-10452.
- Chen Di., Zhao M., Mundy G. R. (2004). "Bone morphogenetic proteins." Growth factors Chur Switzerland **22** (4): 233-41.
- Cho I. J., Kim Y. W., Han C. Y., Kim E. H., Anderson R. A., Lee C. H., Hwang S. J., Kim S. G. (2010). "E-Cadherin antagonizes transforming growth factor β 1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA-dependent Smad3 phosphorylation." Hepatology **52** (6): 2053-64.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques **15**: 532-534, 536-537.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**: 156-159.
- Chudgar S. M., Deng P., Maddala R., Epstein D L., Rao P. V. (2006). "Regulation of connective tissue growth factor expression in the aqueous humor outflow pathway." Mol Vis **12**: 1117-26.

- Chujo et al. (2009). "Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis." Journal of Cellular Physiology **220** (1): 189-795.
- Collaborative-Normal-Tension-Glaucoma-Study-Group (1998a). "Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures." Am J Ophthalmol **126**: 487-497.
- Collaborative-Normal-Tension-Glaucoma-Study-Group (1998b). "The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma." Am J Ophthalmol **126**: 29-38.
- Cousins, S., W., McCabe, M., M., Danielpour, D., Streilein, J., W. (1991). "Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**: 2201-11.
- Coxon K.M., Duggan J., Guo L., Cordeiro M.F., (2010). "Retinal Ganglion Cell Apoptosis and Neuroprotection." Elsevier Ltd.:734-744.
- Crisanti P. et al. (2006). "The role of PKCzeta in NMDA-induced retinal ganglion cell death: prevention by aspirin." Apoptosis an international journal on programmed cell death **11** (6): 983-991.
- Dangaria, Smith. J., Ito Y., Walker C. et al. (2009). "Extracellular matrix-mediated differentiation of periodontal progenitor cells." Differentiation research in biological diversity **78** (2-3): 79-90.
- Djordjevic-Jocic J., Zlatanovic G., Veselinovic D., Jovanovic P., Djordjevic V., Zvezdanovic L., Stankovic-Babic G., Vujanovic M., Cekic S., Zenkel M., Schlotzer-Schrehhardt U. (2012). "Transforming growth factor beta1, matrix-metalloproteinase-2 and its tissue inhibitor in patients with pseudoexfoliation glaucoma/syndrome." Vojnosanit Pregl **69** (3): 231-6.
- Dockrell M. E., Phanish M. K., Hendry B. M. (2009). "TGF-beta auto-induction and connective tissue growth factor expression in human renal tubule epithelial cells requires N-ras." Nephron Exp Nephrol **112** (3): e71-9.
- Dreyer S. D. et al. (1998). "Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome." Nature Genetics **19** (1): 47-50.
- Dubois M. C., et al. (1995). "Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase." The Journal of Biological Chemistry **270** (18): 10618-10624.
- Ehnert S., Zhao J., Pscherer S., Freude T., Dooley S., Kolk A., Stöckle U., Nussler A.K., Hube R. (2012). "Transforming growth factor β 1 inhibits bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy?" BMC Med **10**: 101.
- Estrada K. D., Retting K. N., Chin A. M., Lyons K. M. (2011). "Smad6 is essential to limit BMP signaling during cartilage development." Miner J Bone Res **26** (10): 2498-510.
- Ethier, C.R. (2002). "The inner wall of Schlemm's canal." Exp Eye Res **74**: 161-72.
- Fischer A. J., Schmidt M., Omar G., Reh T. A. (2004). "BMP4 and CNTF are neuroprotective and suppress damage-induced proliferation of Müller glia in the retina." Mol Cell Neurosci **27** (4): 531-42.
- Fleenor D. L., Shepard A. R., Hellberg P. E., Jacobson N., Pang I. H., Clark A. F. (2006). "TGFbeta2-induced changes in human trabecular meshwork: implications for intraocular pressure." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**: 226-234.

- Foster, P. J., R. Buhrmann, H. A. Quigley and G. J. Johnson (2002). "The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys." Br J Ophthalmol **86**(2): 238-42.
- Fraga D., Meulia T., Fenster S. (2008). „Current Protocols. Essential Laboratory Techniques.“ Wiley ans Sons Verlag
- Frassetto L. J., et al. (2006). "Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor." Investigative Ophthalmology & Visual Science **47**(1): 427-438.
- Fuchshofer, R. (2011). "The pathogenic role of transforming growth factor- β 2 in glaucomatous damage to the optic nerve head." Experimental eye research **93**(2): 165–9.
- Fuchshofer R., Birke M., Welge-Lussen U., Kook D., Lütjen-Drecoll, E. (2005). „Transforming growth factor-beta 2 modulated extracellular matrix component expression in cultured human optic nerve head astrocytes." Invest ophthalmol and vis sci **46**(2): 568–78.
- Fuchshofer R., Stephan D. A., Russell P., Tamm E. R. (2009). „Gene expression profiling of TGFbeta2- and/or BMP7-treated trabecular meshwork cells: Identification of Smad7 as a critical inhibitor of TGF-beta2 signaling." Exp Eye Res **88** (6): 1020-32.
- Fuchshofer R., Tamm E. R. (2012). „The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma“ Cell and Tissue Research **347** (1): 279-290.
- Fuchshofer R., Welge-Lüssen U., Lütjen-Drecoll E. (2003). „The effect of TGF-beta2 on human trabecular meshwork extracellular proteolytic system.“ Exp Eye Res **77** (6): 757-65.
- Fuchshofer R., Yu A. H., Welge-Lüssen U., Tamm E. R. (2007). „Bone morphogenetic protein-7 is an antagonist of transforming growth factor-beta2 in human trabecular meshwork cells". Invest Ophthalmol Vis Sci **48**: 715-726.
- Furuta Y., Hogan B. L. M. (1998). "BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo." Genes & Development **12** (23): 3764-3775.
- Galinda-Romero C., Valiente-Soriano F. J. et al. (2013). "Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia." Invest Ophthalmol Vis Sci **54** (2): 974-85.
- Gao, R., Brigstock, D. R. (2003). "Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells." Hepatol Res **27**: 214-220.
- Gao, R., Brigstock, D. R. (2004). "Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan." J Biol Chem **279**:8848-8855.
- Gao, R., Brigstock D. R. (2005). "Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor." Gastroenterology **129** (3): 1019-30.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." Genome Research **6**: 995.
- Godwin A., Jenkins G. (2009). „Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." Biochem Soc Trans **37** (4): 849-54.
- Gorden-Thomson, C., de longh, R., U., Hales, A., M., Chamberlain, C., G., McAvoy, J., W. (1998). "Differential cataractogenic potency of TGF-beta1, -beta2, and -beta3 and their expression in the postnatal rat eye." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**: 1399-409.
- Grant W. M. (1963). "Experimental aqueous perfusion in enucleated human eyes." Arch Ophthalmol **69**:783.

- Gottanka J., Chan D., Eichhorn M., Lütjen-Drecoll E., Ethier C. R. (2004). „Effects of TGF- β 2 in perfused human eyes.” Invest Ophthalmol Vis Sci **45**: 153-158.
- Gottanka, J., Johnson, D. H., Martus, P., Lütjen-Drecoll, E. (1997). "Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork." J Glaucoma **6**: 123-132.
- Granstein, R., D., Staszewski, R., Knisley, T., L., Zeira, E., Nazareno, R., Latina, M., Albert, D., M. (1990). "Aqueous humor contains transforming growth factor.beta and a small (less than 3500 daltons) inhibitor of thymocyte proliferation." J Immunol **144**: 3021-7.
- Graumann und Sasse (2004). „Compact Lehrbuch der Anatomie.“ Stuttgart, Schattauer Verlag **Band 4**, Kapitel 1.2: 19-53.
- Grehn, F. (2005). "Augenheilkunde. 30. Auflage." Heidelberg, Springer Verlag, Kapitel **17**: 295-315.
- Grotendorst, G. R., Okochi, H., Hayashi, N. (1996). "A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene." Cell Growth Differ **7**: 469-480.
- Guo L., et al. (2005). "Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix." Investigative Ophthalmology & Visual Science **46** (1): 175-182.
- Guo L. L., Chen Y. J., Wang T., An J. et al. (2012). „Ox-LDL-induced TGF- β 1 in human alveolar epithelial cells: involvement of the Ras/Erk/PLTP pathway.“ J Cell Physiol **227** (9): 3185-91.
- Hauck S. M. et al. (2008). "Identification of paracrine neuroprotective candidate proteins by a functional assay-driven proteomics approach." Molecular cellular proteomics MCP **7** (7): 1349-1361.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y., Y., Grinnell, B., W., Richardson, M., A., Topper, J., N., Grimbrone, M., A., Jr., Wrana, J., L., Falb, D. (1997). "The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling." Cell **89**: 1165-73.
- Helbig, H., Kittredge, K., L., Coca-Prados, M., Davis, J., Palestine, A., G., Nussenblatt, R., B. (1991). "Mammalian ciliary-body epithelial cells in culture produce transforming growth factor-beta." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **229**: 84-7.
- Heldin C. H., Miyazono K., Dijke P. T. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature **390** (6659): 465-71.
- Heng E. C., Huang Y., Black S. A. Jr., Trackman P. C. (2006). "CCN2, connective tissue growth factor, stimulates collagen deposition by gingival fibroblasts via module 3 and alpha6- and beta1 integrins." J Cell Biochem **98** (2): 409-20.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., et al. (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**: 986-994.
- Hernandez M.R., (2000). "The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling." Prog Retin Eye Res **19**: 297-321.
- Herrnberger L., Ebner K., Junglas B., Tamm E. R. (2012). „The role of plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP) in endothelial cells of Schlemm’s canal and ocular capillaries.“ Exp Eye Res **105**: 27-33.
- Heusinger-Ribeiro, J., Eberlein, M., Wahab, N. A., Goppelt-Struebe, M. (2001). "Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP." J Am Soc Nephrol **12**: 1853-1861.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., et al. (1993). "Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions." Nat Biotech **11**: 1026.

- Ho S. L., Dogar G. F., Wang J., Crean J., Wu Q. D., Oliver N., Weitz S., Murray A., Cleary P. E., O'Brien C. (2005). "Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome." Br J Ophthalmol **89**(2): 169-173.
- Hocking J. C., Hehr C. L., Bertolesi G., Funakoshi H., Nakamura T., McFarlane S. (2009). "LIMK1 acts downstream of BMP signaling in developing retinal ganglion cell axons but not dendrites." Dev Biol **330** (2): 273-85.
- Hocking J. C., McFarlane S. (2007). "Expression of Bmp ligands and receptors in the developing *Xenopus* retina." Int J Dev Biol **51** (2): 161-65.
- Honjo M., Inatani M., Kido N., Sawamura T., Yue B.Y., Honda Y., Tanihara H. (2001). "Effects of protein kinase inhibitor, HA1077, on intraocular pressure and outflow facility in rabbit eyes." Arch Ophthalmol **119** (8): 1171-8.
- Inatani M., Tanihara H., Katsuta H., Honjo M., Kido N., Honda Y. (2001). "Transforming growth factor-beta 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **239**(2): 109-13.
- Inoki, I., Shiomi T., Hashimoto, G., *et al.* (2002). "Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis." Faseb J **16**: 219-221.
- Iyer P., Maddala R., Pattabiraman P. P., Rao P. V. (2012). "Connective tissue growth factor-mediated upregulation of neuromedin U expression in trabecular meshwork cells and its role in homeostasis of aqueous humor outflow." Invest Ophthalmol Vis Sci **53** (8): 4952-62.
- Iwabe S., Moreno-Mendoza N. A., Trigo-Tavera F., Crowder C., Garcia-Sanchez G. A. (2007). "Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma." Vet Ophthalmol **10**: 12-9.
- Jampel, H., D., Roche, N., Stark, W., J., Roberts, A., B. (1990). "Transforming growth factor-beta in human aqueous humor." Curr Eye Res **9**: 963-9
- Jena N., *et al.* (1997). "BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye." Cell Research **230** (1): 28-37.
- Jedsadayanmata A., Chen C. C., Kireeva M. L., Lau L. F., Lam S. C. (1999). "Activation-dependent adhesion of human platelets to Cys61 and Fsp12/mouse connective Anhang 132 tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3)." J Biol Chem **274**(34): 24321-7.
- Jiang C., Moore M.J., Zhang X., Klassen H., Langer R., Young M. (2007). "Intravitreal Injection of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma." Mol Vis **13**: 1783-92.
- Johnson, M. (2006). "What controls aqueous humor outflow resistance?" Exp Eye Res. **82**: 545-557.
- Johnson, M., Erickson, K. (2000). "Mechanisms and routes of aqueous humor drainage." In Principles and Practice of Ophthalmology (Philadelphia: W. B. Saunders Co.): 2577-2595.
- Johnston D., Wu S. M. (1995). "Foundations of cellular neurophysiology." Cambridge, Massachusetts, The MIT Press
- Junglas, B., Kuespert, S., Seleem, A. A., Struller, T., Ullmann, S., Boesl, M. R., *et al.* (2012). "Connective Tissue Growth Factor Causes Glaucoma by Modifying the Actin Cytoskeleton of the Trabecular Meshwork." American Journal of Pathology **180**(6): 2386-2403.

- Junglas, B., Yu, A. H., Welge-Lüssen, U., Tamm, E. R., Fuchshofer, R. (2009). "Connective tissue growth factor induces extracellular matrix deposition in human trabecular meshwork cells." Exp Eye Res **88**(6):1065-75
- Kandell E., Schwartz J., Jessel T. (1996). "Grundlagen der Neurowissenschaft." Heidelberg, Spektrum Verlag.
- Kang Y. J., Shin J. W., Yoon J. H., Oh I. H., Lee S. P., Kim S. Y., Park S. H., Mamura M. (2012). "Inhibition of erythropoiesis by Smad6 in human cord blood hematopoietic stem cells." Biochem Biophys Res Commun **423** (4): 750-6.
- Kanski J. J., Burk A. (2008). "Klinische Ophthalmologie." Lehrbuch und Atlas. München Elsevier, Urban & Fischer.
- Katz B., (1985). "Nerv, Muskel und Synapse." Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Kaufman P.L. (1996). "Pressure-dependent outflow." St. Louis, Mosby, The Glaucomas: 307-33.
- Kerrison J.B., Lewis R.N., Otteson D.C., Zack D.J. (2005). "Bone morphogenetic proteins promote neurite outgrowth in retinal ganglion cells." Molecular Vision **11**: 208-15
- Kim, D.H., Kim, H.S., Ahn, M.D., Chun, M.H., (2004). „Ganglion cell death in rat retina by persistent intraocular pressure elevation." Korean J. Ophthalmol. **18**: 15-22.
- Kirsch M., Lee M. Y., Meyer V., Wiese A. Hofmann H. D. (1997). Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells." J Neurochem **68** (3): 979-90.
- Kitaoka Y. *et al.* (2007). "NMDA-induced interleukin-1beta expression is mediated by nuclear factor-kappa B p65 in the retina." Brain Research **1142**: 247-255.
- Krause C., Guzman A., Knaus P. (2011). „Noggin." Int J Biochem Cell Biol **43** (4): 478-81.
- Krishnamoorthy R. R., Agarwal P., Prasanna G., Vopat K., Lambert W., Sheedlo H. J., Pang I.-H., Shade D., Wordinger R. J., Yorio T., Clark A. F., Agarwal N. (2001). "Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line." Molecular Brain Research **86**: 1-12.
- Krisnamoorthy R. R., Clark A. F., Daudt D., Vishwanatha J. K., Yorio T. (2013). "A forensic path to RGC-5 cell line identification: lesson learned." Invest Ophthalmol Vis Sci **54** (8): 5712-9.
- Kroening S., et al. (2009). "Hypoxia interferes with connective tissue growth factor (CTGF) gene expression in human proximal tubular cell lines." Nephrology Dialysis Transplantation **24** (11): 3319-3325.
- Kuh S. U., Zhu Y., Li J., Tsai K. J., Fei Q., Hutton W. C., Yoon S. T. (2008). "Can TGF-beta1 and rhBMP-2 act in synergy to transform bone marrow stem cells to discogenic-type cells?" Acta Neurochir **150** (10): 1073-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lau L. F., Lam S. C. (1999). "The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection." Experimental Cell Research **248** (1): 44-57.
- Lawrence D. A. (2001). "Latent TGF-beta: an overview." Mol Cell Biochem **219** (1-2): 163-70.
- Leask A., Abraham D. J. (2004) "TGF-beta signaling and the fibrotic response." The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **18** (7): 816-827.

- Lebrun-Julien F., Di Polo A. (2008). "Molecular and cell-based approaches for neuroprotection in glaucoma." *Optometry and vision science official publication of the American Academy of Optometry* **85** (6): 417-424.
- Leske, M.C., Heijl, A., Hussein, M., Bengtsson, B., *et al.*, (2003). "Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial." *Arch Ophthalmol* **121**: 48-56.
- Li J., Tripathi B. J., Tripathi, R. C. (2000). "Modulation of pre-mRNA splicing and protein production of fibronectin by TGF- β 2 in porcine trabecular cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 3437-3443.
- Liang Y., *et al.* (2003). "Comparison of prostaglandin F2alpha, bimatoprost (prostanamide), and butaprost (EP2 agonist) on Cyr61 and connective tissue growth factor gene expression." *The Journal of Biological Chemistry* **278** (29): 27267-77.
- Lindqvist N., Liu Q., Zajadacz J., Franze K., Reichenbach A. (2010). "Retinal glial (Müller) cells: sensing and responding to tissue stretch." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51** (3): 1683-90.
- Lipton, S.A. (2006). "Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond." *Nat Rev Drug Discov* **5**: 160–170.
- Liu B., Sun X., Suyeoka G., Garcia J. G., Leiderman Y. I. (2013). "TGF β signaling induces expression of Gadd45b in retinal ganglion cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54** (2): 1061-9.
- Liu C., Goswami M., Talley J., Cheeser-Martinez P.L., Lou C.H., Sater A.K. (2012). "TAK1 promotes BMP4/Smad1 signaling via inhibition of erk MAPK: a new link in the FGF/BMP regulatory network." *Elsevier Ltd.* Vol **83** (4): 210-19.
- Liu R. M., Vayalil P. K., Ballinger C., Dickinson D. A., Huang W. T. *et al.* (2012). "Transforming growth factor β suppresses glutamate-cysteine ligase gene expression and induces oxidative stress in a lung fibrosis model." *Free radic Bio Med* **53** (3): 554-63.
- Liu S., Blanchard S., Bigou S., Vitry S., Bohl D., Heard J. M. (2009). "Neurotrophin-3 improves delayed reconstruction of sensory pathways after cervical dorsal root injury." *Neurosurgery*
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**: 402-408.
- Luo D., Liu K., Zhu B., Xu X. (2013). "Expression Profiling in Glaucomatous Human Lamina Cribrosa Cells on Graph-clustering Approach." *Curr Eye Res* **38** (7):767-73.
- Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D. (2006). "Der Experimentator: Immunologie." Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag* **2. Auflage**.
- Lütjen-Drecoll, E., Rittig, M., Rauterberg, J., Jander, R., Mollenhauer, J. (1989). "Immunomicroscopical study of type IV collagen in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes." *Exp Eye Res* **48**: 139-47.
- Lütjen-Drecoll, E., Rohen, J. (2001). "Functional morphology of the trabecular meshwork." *JB Lippincott Co*, Philadelphia, Pa.
- Lütjen-Drecoll, E., Shimizu, T., Rohrbach, M., Rohen, J. W. (1986). "Quantitative analysis of "plaque material" in the inner and outer wall of Schlemm's canal in normal and glaucomatous eyes." *Exp Eye Res* **42**: 443-455.
- Maeda A., Nishida T., Aoyama E., Kubota S., Lyons K. M., Kuboki T., Takigawa M. (2009). "CCN Family2/Connective Tissue Growth Factor Modulates BMP Signaling as a Signal Conductor, Which Regulates the Proliferation and Differentiation of Chondrocytes." *J Biochem* **145** (2): 207-216.

- Martinerie, C., Viegas-Pequignot, E., Guenard, I., *et al.* (1992). "Physical mapping of human loci homologous to the chicken *nov* proto-oncogene." Oncogene **7**: 2529-2534.
- Massagué J., Seoane J., Wottom D. (2005). "Smad transcription factors." Genes & Development **19** (23): 2783-810.
- McClain J. A., Philips L. L., Filmore H. L. (2009). "Increased MMP-3 and CTGF expression during lipopolysaccharid-induced dopaminergic neurodegeneration." Neurosci Lett **460** (1): 27-31.
- McDonald V. L., *et al.* "Selection and characterization of a variant of human melanoma cell line, A375 resistant to growth inhibitory effects of oncostatin M (OM): coresistant to interleukin 6 (IL-6)." Growth factors Chur Switzerland **9** (3): 167-75.
- McLaren J. W. (2010). "Control of Aqueous Humor Outflow." Elsevier Ltd.: 369-397.
- Mitu G., Hirschberg R. (2008). "Bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in chronic kidney disease." Front Biosci **13**: 4726-39.
- Miyazawa K., *et al.* (2002). "Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling." Genes to cells devoted to molecular cellular mechanisms **7** (12): 91-1204.
- Modrow, S., Falke D., Truyen U., Schätzl (2010). "Molekulare Virologie. 3. Auflage." Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Moses R.A. (1977). "The effect of intraocular pressure on resistance to outflow." Surv Ophthalmol **22** (2): 88-100.
- Mühlhardt (2009) "Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics." Spektrum Verlag **6. Auflage**.
- Muehlich S., Cicha I., Garlich C. D., Krueger B., Posern G., Goppelt-Struebe M. (2006). "Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor." Am J Physiol **292**: 1732-1738.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Ehrlich H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51** (1): 263-73.
- Munamesa Y., Kitaoka Y. (2012). "Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection." Front. Cell. Neurosci **6**: 60.
- Murphy, M., Crean, J., Brazil, D. P., Sadlier, D., *et al.* (2008). "Regulation and consequences of differential gene expression in diabetic kidney disease." Biochem Soc Trans **36**: 941-945.
- Nakamura, Y., S. Hirano, K. Suzuki, K. Seki, T. Sagara and T. Nishida (2002). "Signaling mechanism of TGF-beta1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(11): 3465-72.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J., L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N., E., Heldin, C., H., ten Dijke, P. (1997). "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling," Nature **389**: 631-5.
- Nonner D., *et al.* (2001). "Bone morphogenetic proteins (BMP6 and BMP7) enhance the protective effect of neurotrophins on cultured septal cholinergic neurons during hypoglycemia." Journal of Neurochemistry **77**(2): 691-699.
- Obata H., *et al.* (1999). "Expression of transforming growth factor-beta superfamily receptors in rat eyes." Acta Ophthalmologica Scandinavica **77** (2): 151-156.
- Ochiai Y, Ochiai H. (2002) "Higher concentration of transforming growth factor-beta in aqueous humor of glaucomatous eyes and diabetic eyes." Jpn J Ophthalmol. **46** (3):249-53.

- Okka M., Tian B, Kaufmann P.L., (2004). „Effects of latrunculin B on outflow facility, intraocular pressure, corneal thickness, and miotic and accommodative responses to pilocarpine in monkeys." Transactions of the American Ophthalmological Society **102**: 251-7.
- Overby, D. R., W. D. Stamer and M. Johnson (2009). "The changing paradigm of outflow resistance generation: towards synergistic models of the JCT and inner wall endothelium." Exp Eye Res **88**(4): 656-70.
- Pang I. H., Zeng H., Fleenor D. L., Clark A. F. (2007). „Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells." BMC Neurosci **8**: 11.
- Parrilla-Reverter G., Agudo M., Sobrado-Calvo P., Salinas-Navarro M. *et al.* (2009). "Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study." Exp Eye Res **89** (1): 32-41.
- Pattabiraman P. P., Rao P. V. (2010). "Mechanistic basis of Rho GTPase-induced extracellular matrix synthesis in trabecular meshwork." Am J Physiol Cell Physiol **298** (3): C749-63.
- Pease M. E., Zack D J., Berlinicke C., Bloom K., Cone F., Wang Y., Klein R L., Hauswirth W. W., Quigley H. A. (2009). „Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **50** (2): 2194-200.
- Peichl L., Buhl E. H., Boycott B. B. (1987a). "Alpha ganglion cells in the rabbit retina." J Comp Neurol **263**(1): 25-41.
- Pfeffer B. A., et al. (1994). "Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye." Experimental Eye Research **59** (3). 323-33.
- Picht G., Welge-Luessen U., Grehn F., Lütjen-Drecoll E. (2001). "Transforming growth factor- β 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **239**: 199-207.
- Pollinger K., Henning R., Ohlmann A., Fuchshofer R., Wenzel R., Breuning M., Tessmar J., Tamm E. R., Goepferich A. (2013). "Lignad-functionalized nanoparticles target endothelial cells in retinal capillaries after systemic application." Proc Natl Acad Sci USA **110** (5): 6115-20.
- Quigley, H.A., (2011). "Glaucoma". The Lancet **377** (9774): 1367-1377.
- Quigley H.A., McKinnon S.J., Zack D.J., Pease M.E, Kerrigan-Baumrind L.A, Kerrigan D.F., Mitchell R.S. (2000). "BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**: 3460-3466.
- Quigley, H.A., (1996). "Number of people with glaucoma worldwide." Br J Ophthalmol.
- Raghunathan V., McKee C., Cheung W., Naik R., Nealey P.F., Russell P., Murphy C.J. (2013). "Influence of extracellular matrix proteins and substratum topography on corneal epithelial cell alignment and migration." Tissue Eng Part A **19** (15-16): 1713-22.
- Roche, A. S. (2003). "Overview of LightCycler Quantification Methods." Technical Note LC 10.
- Roche, A. S. (2001). "Relative Quantification." Technical Note LC 13.
- Sabanay I., Gabelt B. T., Tian B., Kaufmann P. L., Geiger B. (2000). H-7 effects on the structure and fluid conductance of monkey trabecular meshwork. Arch Ophthalmol **118** (7) : 955-62.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M., de la Villa, P., Vidal-Sanz, M., (2009). "Functional and morphological effects of laser-induced

- ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice." Mol. Vis. **15**: 2578-2598.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F.J., Jiménez-López, M., Mayor-Torroglosa, S., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., (2009). "Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration." Exp. Eye Res. **90**: 168-183.
- Samarakoon R., Higgins S. P., Higgins C. E., Higgins P. J. (2008). "TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling." J Mol Cell Cardiol **44** (3): 527-38.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual."
- Sawaguchi S., Yue B.Y., Fukuchi T., Iwata K., Kaiya T. (1992). "Sulfated proteoglycans in the human lamina cribrosa." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**: 2388-2398.
- Segarini, P. R., Nesbitt, J. E., Li, D., *et al.* (2001). "The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor." J Biol Chem **276**: 40659-40667.
- Seki M., Stuart A Lipton S. A. (2008). "Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma." Progress in Brain Research **173**: 495-510.
- Sethi A., Jain A., Zode G. S., Wordinger R. J., Clark A. F. (2011). "Role of TGF- β /Smad Signaling in Gremlin Induction of Human Trabecular Meshwork Extracellular Matrix Proteins." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**: 5251-59.
- Scheufler C., Sebald W., Hülsmeier M. (1999). "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution." Journal of Molecular Biology **287** (1): 103-115.
- Schmierer B., Hill C. S. (2007). "TGF-beta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility." Nature Reviews Molecular Cell Biology **8** (12): 26775-82.
- Sharma P., Fatma N., Kubo E., Shinohara T., Chylack L. T. Jr., Singh D. P. (2003). "Lens epithelium-derived growth factor relieves transforming growth factor-beta1-induced transcription repression of heat shock proteins in human lens epithelial cells." J Biol Chem **278** (22): 20037-46.
- Shen Y., Liu X.-L., Yang X.-L. (2006). "N-methyl-D-aspartate receptors in the retina." Mol. Neurobiol. **34**: 163-179.
- Shi Y., Massagué J. (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Analytical Biochemistry **150** (1): 76-85.
- Shields M.B., Kriegstein G.K. (1993): "Glaukom." Heidelberg, Springer-Verlag **28**.
- Shimo T., Koyama E., Sugito H., Wu C., Shimo S., Pacifici M. (2005). "Retinoid signaling regulates CTGF expression in hypertrophic chondrocytes with differential involvement of MAP kinase." J Bone Miner Res **20** (5): 867-77.
- Slaughter, M.M. (2010). "Glutamate Receptors in Retina." Academic Press, Oxford Encyclopedia of the Eye: 222-26.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., *et al.* (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical Biochemistry **150**: 76.
- Sonnenwald U, Hong Q.U., Aschner M. (2002). "Pharmacology and Toxicology of Astrocyte-Neuron Glutamate Transport and Cycling." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **301**(1): 1-6.

- Streilein, J., W. (1999). "Immunoregulatory mechanisms of the eye." Prog Retin Eye Res **18**: 357-70.
- Streilein, J., W., Ksander, B., R., Taylor, A., W. (1997). "Immune deviation in relation to ocular immune privilege." J Immunol **158**: 3557-60.
- Tamm E. R., Siegnier A., Baur A., Lutjen-Drecoll E. (1996). "Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle-actin expression in cultured human and monkey trabecular meshwork." Exp Eye Res **62**(4): 389-97.
- Tamm, E.R., Fuchshofer, R. (2007). "What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma?". Surv Ophthalmol **52** Suppl 2: 101-4.
- Tomarev, S. I., Wistow, G., Raymond, V., Dubois, S., Malyukova, I. (2003) "Gene expression profile of the trabecular meshwork: NEIBank sequence tag analysis." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**: 2588-2596
- Topper, J., N., Cai, J., Qiu, Y., Anderson, K., R., Xu, Y., Y., Deeds, J., D., Feeley, R *et al.* (1997). "Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 9314-9.
- Tovar-Vidales T., Clark A. F., Wordinger R J. (2011). "Transforming growth factor-beta2 utilizes the canonical Smad-signaling pathway to regulate tissue transglutaminase expression in human trabecular meshwork cells." Exp Eye Res **93** (3): 442-51.
- Trepel (2008). „Neuroanatomie-Struktur und Funktion.“ Urban und Fischer Verlag München **4. Auflage**.
- Tripathi, R., C., Borisuth, N., S., Kolli, S., P., Tripathi, B., J (1993a). "Trabecular cells express receptors that bind TGF-beta 1 and TGF-beta 2: a qualitative and quantitative characterization." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**: 260-3.
- Tripathi, R., C., Li, J., Borisuth, N., S., Tripathi, B., J. (1993b). "Trabecular cells of the eye express messenger RNA for transforming growth factor-beta 1 and secrete this cytokine." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**: 2562-9.
- Tripathi, R., Li, J., Chan, W. F. A., Tripathi, B. J. (1994). "Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF- β 2." Exp Eye Res **58**: 723-727.
- Tripathi, R., C., Chan, W., F., Li, J., Tripathi, B., J. (1994). "Trabecular cells express the TGF-beta 2 gene and secrete the cytokine." Exp Eye Res **58**: 523-8.
- Trousse F., Esteve P., Bovolenta P. (2001). "Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye." Journal of Neuroscience **21** (4): 1292-1301.
- Ueki Y., Reh T. A. (2012). „Activation of BMP-Smad1/5/8 Signaling Promotes Survival of Retinal Ganglion Cells after Damage" PLoS One **7** (6): e38690.
- Ueki Y., Reh T. A. (2013). „EGF stimulates Müller glial proliferation via a BMP-dependent mechanism.“ Glia **61** (5): 778-89.
- Urist M. R. (1965). "Bone: Formation by Autoinduction," Science **150** (3698): 893-899.
- Von Bartheld C. S., Butowt R. (2000). "Expression of neurotrophin-3 (NT-3) and anterograde axonal transport of exogenous NT-3 by retinal ganglion cells in chick embryos." J Neurosci **20** (2): 736-48.
- Wahab N. A., Weston B. S., Mason R. M (2005). "Connective Tissue Growth Factor CCN2 Interacts with and Activates the Tyrosine Kinase Receptor TrkA." J Am Soc Nephrol **16** (2): 340-351.
- Wallentin, N., Wickstrom, K., Lundberg, C. (1998). "Effect of cataract surgery on aqueous TGF-beta and lens epithelial cell proliferation:" Invest Ophthalmol Vis Sci **39**: 1410-8.

- Walsh T. E., Leach L. L., D'Amore P. A. (2011). "TGF- β signaling is required for maintenance of retinal ganglion cell differentiation and survival." Neuroscience **189**: 123-31.
- Welge-Lüssen U., May C. A., Lütjen-Drecoll E. (2000). „Induction of tissue transglutaminase in the trabecular meshwork by TGF- β 1 and TGF- β 2." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**: 2229-2238.
- Wiederholt M., Bielka S., Schweig F., Lütjen-Drecoll E., Lepple-Wienhues A. (1995). "Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye." Exp Eye Res **61**(2): 223-34.
- Wordinger R. J., Agarwal R., Talati M., Fuller J., Lambert W., Clark A. F. (2002). "Expression of bone morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors, and BMP associated proteins in human trabecular meshwork and optic nerve head cells and tissues." Mol Vis **8**: 241-50.
- Wordinger, R. J., Clark, A. F., (2007). "Bone morphogenetic proteins and their receptors in the eye." Exp Biol Med **232**: 979-992.
- Wordinger, R.J., Fleenor, D. L., Hellberg, P. E., Pang, I. H., Tovar, T. O., Zode, G. S., Fuller, J. A., Clark, A. F., (2007). "Effects of TGF-beta2, BMP-4, and gremlin in the trabecular meshwork: implications for glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**: 1191-200.
- Yamamoto, T., Sawada Y., Katayama I., Nishioka K. (2005). "Nodular Scleroderma: Increased Expression of Connective Tissue Growth Factor." Dermatology **211** (3): 218.
- You L., et al. (1999). "Bone morphogenetic proteins and growth and differentiation factors in the human cornea." Investigative Ophthalmology & Visual Science **40** (2): 296-311.
- Yu L., Liu J., Guo S., Xing C., Fan X., Ning M., Yuan J. C., Lo E. H., Wang X. (2009). "Neuroglobin-overexpression alters hypoxic response gene expression in primary neuron culture following oxygen glucose deprivation." Neuroscience **162** (2): 396-403.
- Zhang C. W., Lu Q., You S. W., Zhi Y., Yip H. K., Wu W., So K. F., Cui Q. (2005). "CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but different effects on nitric synthase expression soon after optic nerve injury." Invest Ophthalmol Vis Sci **46** (4): 1497-503.
- Zhang, Y., Derynck, R. (1999). "Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk." Trends Cell Biol **9**: 274-9.
- Zhao S., Chen Q., Hung F. C., Overbeek P. A. (2002). „BMP signaling is required for development of the ciliary body." Development **129** (19): 4435-42.
- Zode G. S., Sethi A., Brun-Zinkernagel A.-M., Chang I.-F., Clark, A. F., Wordinger, R. J. (2011). „Transforming growth factor- β 2 increases extracellular matrix proteins in optic nerve head cells via activation of the Smad signaling pathway." Molecular vision **17**: 1745–58.
- Zode G. S., Clark A. F., Wordinger R. J. (2007). "Activation of the BMP canonical signaling pathway in human optic nerve head tissue and isolated optic nerve head astrocytes and lamina cribrosa cells." Investigative Ophthalmology & Visual Science **48** (11): 5058-67.
- Zode G. S., Clark A. F., Wordinger R. J. (2009). "Bone morphogenetic protein 4 inhibits TGF-beta2 stimulation of extracellular matrix proteins in optic nerve head cells: role of gremlin in ECM modulation." Glia **57** (7): 755-766.
- Zwijssen A., Verschuere K., Huylebroeck D. (2003). „New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades." FEBS Letters **546** (1): 133-39.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	anti oder alpha
β	beta
μ	mikro (10^{-6})
μg	Mikrogramm
\times	-fach/mal
A	Ampere
a	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	zu
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
βB1	Chicken betaB-1 Promotor
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMP-RI/II	Bone Morphogenetic Protein Receptor I/II
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin („bovine serum albumine“)
bzw.	Beziehungsweise
c	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNA	komplementäre DNA (complementary)
CGL	<i>Corpus geniculatum laterale</i>
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
cm	Zentimeter
CWFG	Cold Water Fish Gelatine

Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP-30	2,4,6-tris(dimethylaminomethyl)phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Titrplex III)
Erk	Extracellular-signal regulated Kinase
<i>et al.</i>	und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetal bovine serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung, Guanin
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht
GDNF	Glial Cell line-derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFL	Nervenfaserschicht der retinalen Ganglienzellen
GNB2L	Guanin-nucleotid-bindendes Protein 2
h	Stunde
HAA	Hinterer Augenabschnitt
HF	Hellfeld
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HTM-N-Zellen	Humane Trabekelwerkszellen
I	Iris

IOD	Intraokuläre Druck (Augeninnendruck)
INL	Innere Körnerschicht
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IPL	Innere plexiforme Schicht
J	Joule
JCT	Juxtakanalikulärer Region des TWs
k	Kilo
K	Kornea
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KW	Kammerwinkel
l	Liter
LC	<i>Lamina cribrosa</i>
LEDGF	Lens Derived Growth Factor
m	Meter oder milli
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Magermilch
mM	Milimol/Liter
mm	Milimeter
mock	negativ Kontrolle
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NTF-3	Neurotrophin-3
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

ONL	Äußere Körnerschicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEDF	Pigment Epithelium Derived Factor
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen einer Lösung
Php	Phosphatpuffer
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
pSmad	Phosphoryliertes Smad Protein
PVDF	Polyvinylfluorid
RGZ-Zellen	Retinale Ganglienzellen
RhoA	Kleine GTPase Protein A
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Protein Kinase
RPE	Retinales Pigmentepithelschicht
RPL32	Ribosomales Protein L32
RT	Reverse Transkription, Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SK	Schlemm'schen Kanal
Smad	small body size and mothers against decapentaplegic Protein
Strep	Streptomycin
SV40	Simian-Virus 40
t	Thymin

Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TBS mit EDTA
TBS	Tris-Kochsalz-Puffer ("tris buffered saline")
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trangene Tiere, CTGF-Überexpressionsmäuse, β B1-Maus
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
T β -RI/II	Transforming Growth Factor beta Receptor I/II
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TW	Trabekelwerk
TWZ	Trabekelwerkszellen
Upm	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VAA	Vorderer Augenabschnitt
W	Watt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZK	Ziliarkörper

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Papille (Sehnervenkopf) eines gesunden (A) und eines Patienten mit POWG (B).....	10
Abbildung 2-2: Kammerwinkel mit Trabekelwerk, Schlemm'schen Kanal, Iris und Ziliarkörper.....	12
Abbildung 2-3: Darstellung der Innenwand des Schlemm'schen Kanals (SK) und der angrenzenden kribriformen Region des Trabekelwerks (TW) (Lütjen-Drecoll <i>et al.</i> , 2001).....	13
Abbildung 2-4: Konventioneller Kammerwasserabfluss (modifiziert nach McLaren 2010).....	15
Abbildung 2-5: Aufbau der Retina	16
Abbildung 4-1: Bestätigung eines konstitutiv aktiven BMP-Signalwegs in HTM-N-Zellen mittels pSmad1/5/8.....	80
Abbildung 4-2: Verifizierung eines konstitutiv aktiven BMP-Signalweg <i>in vivo</i> mittels immunhistochemischer Färbung gegen pSmad1/5/8.	81
Abbildung 4-3: In VAA der TG-Tiere konnte eine stark abgeschwächte Aktivität des BMP-Signalwegs im Vergleich zu den WT-Tieren detektiert werden.....	82
Abbildung 4-4: CTGF inhibierte den BMP-Signalweg so effizient wie Noggin.....	82
Abbildung 4-5: Expressionsmuster von BMP4 und 7 im VAA von TG-Tieren (8 Wochen) war unterschiedlich und signifikant reduziert.....	84
Abbildung 4-6: Die CTGF-Überexpression von 2 Monate alten Tieren führte zu einem mRNA- und Proteinexpressionsabfall von BMP4 und -7.....	85
Abbildung 4-7: Die Gremlin Expression war in 8 Wochen alten TG-Mäusen signifikant erhöht.....	87
Abbildung 4-8: Induktion von TGF- β 1 und - β 2 in 2 Monate alten TG-Tieren.....	88
Abbildung 4-9: Die immunhistochemische Färbung gegen TGF- β 2 verifizierte eine Erhöhung in den anterioren Bereichen der TG-Mäuse.....	89
Abbildung 4-10: Induktion von TGF- β 1, TGF- β 2 und CTGF nach Behandlung von HTM-N-Zellen mit unterschiedlichen CTGF-Konzentrationen (5, 50 und 100 ng/ml).	90
Abbildung 4-11: Der Erk-pathway war verantwortlich für die durch CTGF-vermittelte Induktion der mRNA- und Protein-Level von TGF- β 1, TGF- β 2 und CTGF selbst.....	94

Abbildung 4-12: Der Erk-pathway ist verantwortlich für die durch CTGF-vermittelte Induktion der Protein-Level von TGF- β 1 und -2.....	95
Abbildung 4-13: Der RhoA/ROCK-Signalweg hatte auch Einfluss auf die Regulation der CTGF-vermittelten TGF- β 1-, TGF- β 2- und der Auto-Induktion von CTGF.....	97
Abbildung 4-14: Die Proteinsynthese von TGF- β 1 und -2 wurde nach Inhibition des RhoA/ROCK-Signalweges minimiert.....	99
Abbildung 4-15: CTGF hat einen positiven Einfluss auf die Signalantwort von TGF- β in 8 Wochen alten β B1-Mäusen.....	100
Abbildung 4-16: CTGF führt zu einem erhöhten pSmad2-Spiegel im VAA von 8 Wochen alten transgenen Tieren.....	101
Abbildung 4-17: Induktion der mRNA-Expression von Smad6 durch CTGF in 2 Monate alten TG-Mäusen.....	102
Abbildung 4-18: Ausdifferenzierte 661-W-Zellen nach Inkubation von Staurosporin.	104
Abbildung 4-19: Verifizierung einer konstitutiv aktiven BMP-Signalantwort und des auf diesen Signalweg hemmenden Effekts von CTGF in 661-W-Zellen.....	105
Abbildung 4-20: Die Überexpression von CTGF in 8 Wochen alten β B1-Mäusen hemmte die BMP-Signalantwort.	106
Abbildung 4-21: Expressionmuster von BMP4 und -7 im HAA von WT- und TG-Tieren war unterschiedlich und signifikant reduziert.....	108
Abbildung 4-22: Die CTGF Überexpression von 2 Monate alten Tieren führte zu einem mRNA- und Proteinexpressionsabfall von BMP4 und -7.....	109
Abbildung 4-23: CTGF induzierte eine höhere TGF- β -Signalantwort im posterioren Bereich der TG-Mäuse.....	110
Abbildung 4-24: Reduktion des mRNA-Levels von Smad7 in Retinae 8 Wochen alter TG-Mäuse.....	111
Abbildung 4-25: Kein Unterschied in der Axonanzahl des Sehnervs PBS- und CTGF-intravitreal-injizierter CD1-WT-Tiere.....	113
Abbildung 4-26: Intravitreal-injiziertes CTGF zeigten eine leicht erhöhte Anzahl an TUNEL-positiven RGZ-Zellen in CD-1-WT-Mausaugen.....	115
Abbildung 4-27: CTGF erniedrigt die Zellviabilität der 661-W-Zellen, während dieser Effekt durch BMP7 abgefangen wird.....	116

Abbildung 4-28: Die Viabilität von primären murinen RGZ-Zellen konnte durch den Einsatz von BMP4 und -7 gesteigert werden, während CTGF diesen protektiven Effekt verringerte.....	118
Abbildung 4-29: BMP7 wirkte sich nach einem NMDA-induzierten Schaden protektiv auf die Überlebensfähigkeit von 661-W-Zellen aus.....	119
Abbildung 4-30: Im Schadensmodell führte CTGF, 21 Tage nach intravitrealer Injektion in Kombination mit NMDA, zu einem erhöhten Verlust an RGZ-Zellen, während BMP7 dem Niedergang entgegenwirkt.....	122
Abbildung 4-31: CTGF und Stress induzierten und BMP7 reduzierte die Apoptose von RGZ-Zellen nach intravitrealer Injektion von CD1-WT-Mausaugen.....	124
Abbildung 4-32: Die RGZ-Zellen wurden im Stressmodell durch CTGF-vermittelte Inhibition des BMP-Signalwegs verletzlicher für Außeneinflüsse.....	126
Abbildung 4-33: Die Expression von BMP7 wurde durch CTGF im NMDA-Stressmodell signifikant reduziert.....	127
Abbildung 4-34: Die mRNA-Expression von PEDF, LEDGF und GDNF war 24 h nach Behandlung von 661-W-Zellen durch CTGF in Kombination mit Stress gehemmt..	129
Abbildung 4-35: Der Gehalt an NTF-3, LEDGF und FGF2 nach intravitrealer Injektion von CD1-WT war als nicht einheitlich zu bewerten.....	131
Abbildung 4-36: Reduktion von BDNF, CNTF und NTF-3 in Retinae 8 Wochen alter CTGF-Überexpressionsmäuse.....	132
Abbildung 4-37: BDNF war im <i>Nervus opticus</i> 8 Wochen alter transgener Tiere reduziert.....	134

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Reagenzienübersicht.....	28
Tabelle 3-2: Enzyme und Reagenzien-Kits.....	31
Tabella 3-3: Übersicht über die für die quantitative Real-Time RT-PCR verwendeten Primer	31
Tabelle 3-4: Übersicht über die bei der Genotypisierung verwendeten Primer.....	33
Tabelle 3-5: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.....	34
Tabelle 3-6: Übersicht über die eingesetzten Sekundärantikörper.....	34
Tabelle 3-7: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern.....	35
Tabelle 3-8: Geräteübersicht.....	38
Tabelle 3-9: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.....	40
Tabelle 3-10: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR.....	42
Tabelle 3-11: Thermocyclerprogramme für die SV40- und β B1-Genotypisierungs-PCR.....	43
Tabelle 3-12: Bestandteile für einen „+RT“-/“-RT“-/H ₂ O-Master-Mix-Ansatz.....	48
Tabelle 3-13: Zusammensetzung der SDS-Gele.....	51
Tabelle 3-14: Aufbau Semidry-Blot.....	53
Tabelle 3-15: Übersicht über die nachgewiesenen Proteine und die spezifischen Antikörper.....	54
Tabelle 3-16: Übersicht der als Ladungskontrolle verwendeten Antikörper.....	57
Tabelle 3-17: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien.....	58
Tabelle 3-18: Behandlungsschemata der Mek1/2-Inhibitor- und CTGF-behandelten HTM-N-Zellen.....	60
Tabelle 3-19: Behandlungsschemata der Fasudil- und CTGF-behandelten HTM-N-Zellen.....	61
Tabelle 3-20: Übersicht der Kombinationsbehandlungen von CTGF und BMP7 an 661W-Zellen.....	64
Tabelle 3-21: : Übersicht der Kombinationsbehandlungen von CTGF und BMP7 an RGZ-Zellen im NMDA-Schadensmodell.....	65
Tabelle 3-22: Übersicht über die intravitreal-injizierten Kombinationen von CTGF, BMP7 und NMDA.....	70
Tabell 3-23: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei immunhistochemischen Färbungen.....	75

10 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei PD Dr. Rudolf Fuchshofer für die Übernahme des Erstgutachtens sowie die interessante Fragestellung dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich Ihm für die umfassende Unterstützung bei meiner Arbeit, die stets freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und das Vertrauen was er mir entgegengebracht hat bedanken!

Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm für die Integration und Unterstützung an seinem Lehrstuhl bedanken.

Auch gilt mein Dank dem Elitenetzwerk Bayern, die mich und meine Arbeit, durch ein dreijähriges Forschungsstipendium finanziell gefördert haben.

Darüber hinaus möchte ich Lena Schneider, Andrea Dillinger, Corinna Göppner und Gregor Weber für die kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit der AG Fuchshofer bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich herzlichst bei der Margit Schimmel, Angelika Pach, Silvia Babl, Elke Stauber und Eva Zitzelsperger für die umfassende Hilfe bei histologischen und molekularbiologischen Analysen bedanken.

Während meiner Doktorarbeit habe ich innerhalb dieser Arbeitsgruppe viele liebe Arbeitskollegen, aber auch neue Freunde gefunden, mit denen ich auch außerhalb des Labors sehr viel Spaß hatte (Danke Rosi, Leo, Patrick, Birgit, Steffi, Lena und Co.). Patrick dir auch noch danke für die nette Schreibtischnachbarschaft. Ich hoffe, dass wir alle auch weiterhin Freunde bleiben werden!

Doch auch außerhalb des Labors möchte ich einigen Leuten danken: Ruth, Silke, Julia, Jessy, Caro, Sebastian, Tommi, Flo U., Flo W. und vielen Anderen. Danke, dass ihr immer soviel Interesse für meine Arbeit aufgebracht habt und mir immer gute Freunde seid!

Von Herzen danke ich auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer in meinen Entscheidungen gestärkt, unterstützt und gefördert haben. Auch meinem Mann Andreas gilt ein besonderer Dank. Er hat während der Promotionszeit immer geduldig versucht zu verstehen was ich im Detail arbeite, mich immer motiviert und hat immer an mich geglaubt!

Meine Dissertation möchte ich meinem in diesem Jahr verstorbenen Großvater widmen. Er hat mich sehr geprägt und war mir der beste Opa den man sich wünschen konnte.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 31.10. 2013

Sabrina Küspert

